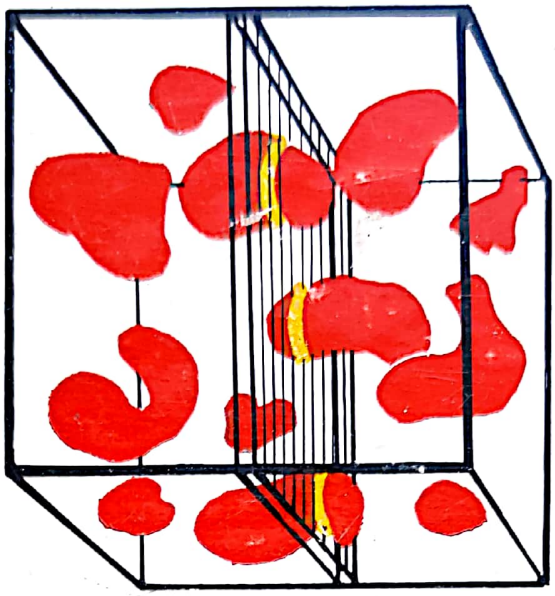


C. TAȘCĂ

# INTRODUCERE ÎN MORFOLOGIA CANTITATIVĂ CITO-HISTOLOGICĂ

Scanned with OKEN Scanner

C. TAȘCĂ

# INTRODUCERE ÎN MORFOLOGIA CANTITATIVĂ CITO-HISTOLOGICĂ

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București 1976

Scanned with OKEN Scanner

# Cuprins

PREFAȚĂ . . . . . 9

1. *MODIFICĂRILE VOLUMELOR NUCLEARE* . . . . . 11

*Modificări nucleare fiziologice* . . . . . 11

Diviziunea celulară, 11

Conținutul în ADN și volumul nuclear, 13

Modificări nucleare volumetrice funcționale, 14 ◆ Regenerarea și volumul nuclear, 15

*Modificări nucleare patologice* . . . . . 15

*Factori generali afectînd volumul nuclear* . . . . . 16

2. *CARIOCITOMETRIA* . . . . . 19

*Metode de măsurare a volumului nuclear* . . . . . 19

Măsurători directe, 20 ◆ Metode de microproiecție, 21 ◆ Instrumente automate și semiautomate de măsurare 22

*Calcularea volumului nuclear* . . . . . 24

Alegerea formulelor pentru calculul volumului nuclear, 25

*Efectul tehnicilor histologice curente în cariocitometrie* . . . . . 26

Efectul fixării, 26 ◆ Efectul includerii, 27 ◆ Rolul secționării și măsurătorile cariocitometrice, 27 ◆ Efectul colorării, 27

3. *CITOFOTOMETRIA* . . . . . 28

*Principiile metodei citofotometrice* . . . . . 28

*Erori în citofotometrie* . . . . . 32

Erori produse de obiectul biologic, 32 ◆ Erori produse de aparatură, 36 ◆ Erori produse de cercetător, 37

*Aparatura citofotometrică* . . . . . 38

Sursele de lumină, 40 ◆ Monocromatorul, 40 ◆ Microscopul, 40 ◆ Capul fotometric, 41 ◆ Aparate cu scopuri multiple, 41 ◆ Aparate pentru studiul rapid al populațiilor celulare. 42 ◆ Aparate cu preselecția cîmpului de măsurat, 42

*Microspectrofotometria în lumină ultravioletă* . . . . . 43

*Aplicații ale citofotometriei* . . . . . 44

4. *TEHNICI DE COLORAȚIE PENTRU EVIDENȚIEREA ACIZILOR NUCLEICI ȘI PROTEINELOR* . . . . . 47

*Tehnici de coloraţie pentru evidenţierea acizilor nucleici* . . . . . 47

Coloraţia HCl-Feulgen-Schiff, 47 ◆ Coloraţia galocianin-cromalaun, 50

Scanned with OKEN Scanner

Determinarea separată a ADN şi a ARN, 51 ◆ Condiţii de colorație 52 Utilizarea nucleazelor, 53

*Tehnici de coloraţie pentru evidenţierea proteinelor* . . . . . 53
Reacţia Millon, 53 ◆ Reacţia Sakaguchi, 54 ◆ Procedee de legare a coloranţilor acizi, 54 ◆ Metode pentru histone şi protamine, 54.

**5.** *MICROSCOPIA DE INTERFERENŢĂ* . . . . . 57

*Principiile microscopiei de interferenţă* . . . . . 57
Evaluarea datelor în microscopia de interferenţă, 57

*Aplicaţii ale microscopiei de interferenţă* . . . . . 60
Ţesutul epitelial pavimentos, 60 ◆ Fibrele miocardice, 61 ◆ Limfocitele sanguine, 62 ◆ Boala canceroasă, 63

**6.** *MICROSCOPIA CU RAZE X* . . . . . 65

*Formarea imaginilor la raze X* . . . . . 65
*Aplicaţii ale microradiografiei* . . . . . 66

**7.** *CITOFLUORIMETRIA* . . . . . 68

*Principiile metodei citofluorimetrice* . . . . . 68
*Aplicaţii ale citofluorimetriei* . . . . . 70

**8.** *FILMUL-SUBSTRAT CA METODĂ DE CITOCHIMIE CANTITATIVĂ* 72

*Aparatura necesară determinărilor cantitative pe filmul-substrat* . . . . . 72
*Aplicaţii ale citochimiei cantitative pe filmul-substrat* . . . . . 73

**9.** *NOŢIUNI DE STEREOLOGIE* . . . . . 75

*Analiza volumetrică* . . . . . 75
*Măsurarea suprafeţelor* . . . . . 77
*Raportul suprafaţă — volum (S/V)* . . . . . 78
*Măsurarea grosimii medii* . . . . . 79
*Estimarea numărului de particule subcelulare* . . . . . 80
*Aplicaţii ale stereologiei.* . . . . . 82
Morfometrie pulmonară, 82 ◆ Morfometrie hepatică, 82

**10.** *PRINCIPII DE AUTOHISTORADIOGRAFIE CANTITATIVĂ* . . . 85

*Estimarea cantitativă a autohistoradiografiilor* . . . . . 85
*Aplicaţii ale autohistoradiografiei cantitative* . . . . . 87

**11.** *MICROSCOPIA CANTITATIVĂ SISTEMICĂ CITO-HISTOLOGICĂ* 89

*Ţesutul epitelial* . . . . . 89
*Ţesutul conjunctiv* . . . . . 102
*Miocardul* . . . . . 102
*Eritrocitul embrionar* . . . . . 107

Scanned with OKEN Scanner

*Țesutul limfo-reticulo-histiocitar* . . . . . 109
*Tubul digestiv* . . . . . 111
Cavitatea bucală, 111 ◆ Stomacul, 112 ◆ Intestinul, 112 ◆ Pancreasul exocrin, 112 ◆ Ficatul, 113
Efectul substanțelor toxice asupra nucleilor hepatocitari, 116
Morfopatologia hepatică cantitativă, 116
Hepatita epidemică, 116 ◆ Ciroza hepatică, 118
*Aparatul urinar* . . . . . 123
Rinichiul, 123 ◆ Vezica urinară, 123
*Aparatul genital* . . . . . 123
Ovarul, 123 ◆ Trompa, 125 ◆ Uterul, 125 ◆ Placenta, 126 ◆ Glanda mamară, 126 ◆ Testiculul, 126
*Glandele endocrine* . . . . . 128
Hipofiza, 128 ◆ Epifiza, 128 ◆ Suprarenala, 128 ◆ Tiroida, 129 ◆ Paratiroida, 133 ◆ Pancreasul endocrin, 133
*Sistemul nervos* . . . . . 133
*Boala canceroasă* . . . . . 138
Oncologie experimentală, 140 ◆ Morfologia cantitativă a tumorilor umane, 152
AN INTRODUCTION TO A QUANTITATIVE CYTO-HISTOLOGICAL MORPHOLOGY (SUMMARY) . . . . . 159
BIBLIOGRAFIE . . . . . 161

Scanned with OKEN Scanner

# PREFAȚĂ

*De la început, lucrarea* Introducere în morfologia cantitativă cito-histologică *impresionează prin multitudinea și noutatea domeniilor și posibilităților de explorare cantitativă în citologie, constituind o reușită sinteză a momentelor sale evolutive și a experienței autorului.*

*Vechi preocupări de citometrie, situate la începutul deceniului al 4-lea, mă încurajează să prezint această valoroasă și necesară lucrare care, prin apariția sa, marchează un „up to date" în literatura internațională și continuitatea în căutarea unei expuneri matematice a relațiilor nucleo-plasmatice, a volumului nuclear, a activității citoenzimatice și a structurilor subcelulare vizibile electronmicroscopic.*

*Un imens cîmp cu vast orizont de investigare se oferă în epoca noastră citologiei, în care a pătruns cu repeziciune și extensiune tehnica modernă de investigare. Aplicațiile în morfo-și citopatologie stabilesc o punte continuă între abordarea inițială biologică și introducerea ei în studiul și practica patologiei. Autorul susține în această ordine de idei că se poate vorbi de un „sindrom morfopatologic nuclear numeric", bazat pe o formulă cantitativă nucleară, asemănătoare cu cea leucocitară, capabilă să permită un diagnostic, prognostic și urmărirea evolutivă a unui proces celular. Aparatura modernă permite un „screening" al populațiilor celulare și aprecierea statistică a rezultatelor, ceea ce demonstrează că ne aflăm în plină metodologie și gîndire matematică a citologiei!*

*Monografia este bogată în informații și prin accesibilitatea pe care o oferă în tehnologia citometriei, risipită în numeroase publicații de specialitate. Sînt prezentate astfel succesiv cariocitometria citofotometria, microscopia de interferență, microscopia cu raze roentgen, citofluorescența, stereologia și autohistoradiografia. Posibilitățile tehnice de investigare cantitativă sînt considerabile și orice minimalizare a lor în biologia celulară și subcelulară apare necorespunzătoare și generată de necunoaștere sau plafonare într-o tehnică depășită.*

*Prin aplicarea morfologiei cantitative în cercetarea anatomoclinică în unele categorii morbide (hepatice, endocrine, reticulo-endoteliale și neurologice), autorul reușește să demonstreze că există o corelație între formula nucleară cantitativă și tabloul histopatologic integrat în contextul său anatomoclinic. Scăderea odată cu vîrsta a volumului nucleilor cu menținerea constantă a concentrației de acizi nucleici contribuie la cunoașterea fenomenelor moleculare de involuție, conferindu-i rangul de constantă biologică a organismului.*

*Într-o situație gnoseologică asemănătoare se situează și corelația dintre cantitatea de acizi nucleici și volumul nuclear, ca un prim fenomen*

Scanned with OKEN Scanner

*sesizabil citomolecular în diferențierea celulară, caracteristic procesului de oncogeneză la acest nivel. Posibilitatea de abordare matematică și de sintetizare într-o ecuație stochastică a fenomenelor are valoarea unui indicator incomparabil prin precizie și moment de apariție.*

*Epuizarea domeniilor de cercetare într-o singură monografie ar fi greu de realizat, însă toate datele prezentate sînt corect și critic selectate, operație ce a fost mult ajutată de experiența personală a autorului, remarcabilă din multe puncte de vedere și validată printr-o repetată confruntare internațională.*

*Pentru orice biolog interesat de citologie în general și de morfologia cantitativă în special, monografia are cel puțin valoarea unei introduceri în problematică; pentru cei ce lucrează în aceste domenii va deveni fără îndoială un ghid necesar. Nu vor lipsi din această ultimă categorie morfologii, citologii și anatomo-patologii, permanent și obligatoriu interesați de mișcarea ideilor, a tehnicilor și faptelor în aceste domenii, în care a pătruns gîndirea matematică și conceptul molecular.*

*Academician* ȘTEFAN MILCU

Scanned with OKEN Scanner

# 1. Modificările volumelor nucleare

## Modificări nucleare fiziologice

Factorii fiziologici intervin în modificarea volumelor nucleare prin două modalităţi : diviziunea celulară şi schimbările funcţionale nucleare. Dealtfel primele observaţii cariometrice au avut caracter funcţional; Hodge (272), Vas (545) şi Mann (355) au măsurat volumele nucleare în neuroni după stimulare electrică; Morpurgo (385) şi Lukianow (349) urmăresc efectul postului asupra celulelor hepatice, pancreatice şi renale.

Odată cu cercetările lui Jacobj (283), (284), (285) cariometria tinde să se orienteze spre cauzele genetice ale modificărilor volumetrice nucleare.

### Diviziunea celulară

Observaţiile privind diviziunea celulară au dus la descifrarea unor relaţii cariometrice importante.

*Raportul nucleo-plasmatic.* Cercetări datorate lui Hertwig (262) au arătat încă din 1903 că între mărimea nucleului şi a celulei există o corelaţie strînsă şi că raportul nucleo-plasmatic (N/P) rămîne aproximativ constant. Mai tîrziu, lucrările lui Hartmann (231), Körner (312), Grimm (216) au stabilit o corelaţie similară între mărimea nucleului şi a nucleolului.

Raportul nucleo-plasmatic este un parametru caracteristic pentru celulele în repaus : variatele tipuri celulare au raporturi nucleo-plasmatice diferite (28), (60), (95), (133), (140), (157), (160), (199), (205), (206), (231), (236), (237), (238), (342), (356), (561). După Cruz şi Lison (109) nucleul şi citoplasma prezintă modificări de tip alometric.

În condiţii patologice, raportul N/P este complet modificat; în special în cancere lipsa corelaţiei N/P poate fi patognomonică (97), (103), (152), (153), (181), (220), (493).

Modificări ale funcţiei celulare afectează şi metabolismul celular : apar variaţii ale sintezei proteice, ale stocajului, producţiei sau excreţiei diferiţilor metaboliţi. Volumul citoplasmei depinde de activitatea nucleară, deci de volumul nuclear. Schimbările volumetrice nucleare, rezultat al modificărilor funcţionale, preced transformările volumului citoplasmatic. Astfel, la începutul fazei de hiperactivitate, raportul nucleo-citoplasmatic creşte. La sfîrşitul acestei faze volumul citoplasmatic continuă să rămînă crescut, datorită hidratării şi stocajului de substanţe care însoţesc sinteza proteică. Celulele cu un conţinut bogat de substanţe importante meta-

Scanned with OKEN Scanner

bolic (hormoni, fermenţi, lipide) au un raport N/P scăzut în timpul fazei pasive. În faza activă, citoplasma este în stare de depleţie; raportul N/P creşte, deoarece pierderea de apă şi de alte substanţe din citoplasmă precede pierderea materialului nuclear. Restaurarea balanţei osmotice dintre nucleu şi citoplasmă determină revenirea temporară spre normal a raportului N/P; în acest moment metabolismul celular se intensifică spre a înlocui materialul citoplasmatic pierdut; ca prim rezultat al creşterii metabolismului este mărirea volumului nuclear cu creşterea consecutivă a raportului N/P. Înainte şi după diviziune (283), (284), raportul N/P este identic, dar variază considerabil în timpul diviziunii celulare.

*Constanţa cromozomilor şi mărimea nucleară.* După Boveri (55), Erdmann (161), (162), Jacobj (283), (284), (285), (286), (287), (288), Hertwig (252), (253), (254), (255), (256), (257), (258), (259), (261), Ehrich (152), (153), Grafl (212), Kolb (309), (310), Sparrow şi colab. (503), mărimea nucleară depinde de numărul cromozomilor. Volumul nucleilor diploizi este dublu faţă de al celor haploizi. Aceste observaţii stau la baza principiului creşterii ritmice, enunţat de Jacobj (283), (284).Măsurătorile cariometrice asociate cu numărătorile de cromozomi au confirmat în parte aceste observaţii (45), deşi există numeroase celule cu număr identic de cromozomi, dar cu volume nucleare diferite. În special în cazul celulelor poliploide numărul de cromozomi nu este proporţional cu mărimea nucleară (45), (438), (439). Intervin aici numeroşi alţi factori fiziologici şi patologici.

*Creşterea ritmică.* Jacobj (283) a susţinut ipoteza că volumul nuclear al celulelor în repaus este constant şi determinat de numărul de cromozomi. În mitoză, volumul nuclear se înjumătăţeşte, deoarece numărul de cromozomi scade la jumătate. Dedublarea numărului de cromozomi atrage dublarea volumului nuclear. Plecînd de la acest principiu, Jacobj clasifică nucleii în funcţie de numărul de cromozomi. Denumind $K_1$ clasa nucleară de bază, Jacobj situează nucleii proveniţi prin înjumătăţire în clasele $K_{1/2}$, $K_{1/4}$, $K_{1/8}$, iar cei produşi prin dedublare în clasele $K_2$, $K_4$, $K_8$. Volumul nucleilor unei clase ar fi exact jumătate din volumul clasei următoare sau dublul volumului nuclear din clasa precedentă. Combinînd principiul creşterii ritmice cu constanţa raportului N/P s-a presupus că şi volumul citoplasmei se înjumătăţeşte şi se dublează ritmic (248), (267).

Principiul creşterii ritmice se suprapune perfect regulei de constanţă a cromozomilor, dar mult mai puţin ritmicităţii volumelor nucleare. Deşi raportul 1 : 2 : 4 : 8 este întîlnit la numeroase celule (252), (253), (254), (255), (256), (257), (258), (259), (260), (261), (283), (284), (285), (286), (287), (288), mulţi nuclei nu se încadrează în nici una dintre clasele amintite. Jacobj (287) şi Hertwig (258), (259) au introdus atunci „ipoteza suprafeţei", care postulează că mărirea nucleului se face prin multiplicare cu $\sqrt[3]{4}$. La baza acestei ipoteze stă observaţia lui Boveri (55) şi Herbst (248), după care numărul de cromozomi este proporţional în special cu suprafaţa nucleară. A apărut necesară totodată introducerea conceptului de clase nucleare intermediare („Zwischenklassen") (259). Seria de clase nucleare astfel corectată stă la baza clasificării logaritmice a lui Hintzsche (268) şi Wilflingseder (563). Ipoteza suprafeţei se verifică

numai pentru un număr limitat de tipuri celulare, în special în culturi şi în frotiuri. Bucher şi Horisberg (67) au stabilit că o creştere a suprafeţei nucleare cu $\sqrt[3]{4}$ corespunde unei dedublări a volumului nuclear.

Teoretic, principiul creşterii ritmice rămîne nemodificat şi se întîlneşte în organele cu ritm rapid de diviziune : testicul, ficat, unde nucleii tetra-, octo- şi poliploizi sînt relativ frecvenţi. Traseul cariometric prezintă maxime la clasele corespunzînd acestor nuclei, dar volumul nuclear al organului respectiv rămîne predominant.

## *Conţinutul în ADN şi volumul nuclear*

Pornind de la ideea că ADN apare exclusiv în cromozomi, s-a ajuns la concluzia că modificările numărului de cromozomi pot da indicaţii asupra variaţiilor cantităţii de ADN. După principiul creşterii ritmice, pe de o parte, şi din relaţia număr de cromozomi — mărime nucleară, pe de altă parte, ar reieşi că volumul nuclear variază direct proporţional cu cantitatea de ADN. În realitate, relaţia de mai sus apare rareori în formularea menţionată. De aici unele rezultate contradictorii, ca şi părerea unor autori că metodele cariometrice nu sînt cele mai adecvate pentru urmărirea modificărilor celulare. Cercetările în acest domeniu au fost extrem de numeroase şi variate, cu argumente pro sau contra dozărilor cantitative de acizi nucleici la nivel de nucleu (72), (170), (175), (218) (241), (333), (340), (341), (374), (421), (422), (446), (494), (495), (501), (519), (520), (521), (522), (547). Se consideră că nucleii celulelor în repaus, de acelaşi tip şi aceeaşi mărime au un conţinut identic în ADN ; volumul nuclear al celulelor în repaus este proporţional cu conţinutul lor în ADN. Creşterea sau scăderea activităţii funcţionale nucleare se reflectă în corelaţia ADN — volum nuclear. În organele unde predomină diviziunile amitotice şi endomitotice se constată o relaţie liniară între conţinutul în ADN şi volumul nuclear, precum şi între numărul de cromozomi şi volumul nuclear.

O scurtă trecere în revistă a tipurilor de diviziune celulară este aici necesară spre a înţelege mai bine raporturile existente între numărul de cromozomi şi variaţia volumelor nucleare.

A m i t o z a se observă în special în celulele ţesuturilor diferenţiate : ficat, rinichi, corticosuprarenală, tiroidă, miocard. În aceste cazuri se aplică principiul creşterii ritmice, deoarece o modificare a numărului de cromozomi atrage o schimbare a volumului nuclear. Suma volumelor nucleare ale celulelor-fiice este egală cu volumul nuclear al celulei-mame (177), (196), (219), (269), (270), (291), (292), (372), (373), (553). În majoritatea cazurilor, amitoza este urmată de endomitoză, ducînd la dedublarea numărului de cromozomi şi, consecutiv, la dedublarea volumului nuclear. În cazul regenerării şi al proliferărilor neoplazice, amitoza devine frecventă în ţesuturile în care mitoza este de regulă.

M i t o z a, în cursul căreia celulele trec prin mai multe faze, conduce, la început, la înjumătăţirea cromozomilor, apoi la înjumătăţirea nucleului şi, în sfîrşit, la înjumătăţirea citoplasmei. Celulele-fiice posedă acelaşi număr de cromozomi ca şi celula-mamă. După diviziunea completă, volumul nuclear atinge valoarea iniţială, dinaintea diviziunii. La începutul

mitozei, în profază, nucleul absorbind apă îşi măreşte volumul. În metaşi anafază, membrana nucleară dispare, ceea ce face imposibilă dimensionarea nucleară. În telofază, volumul nuclear revine la valoarea din celula-mamă.

Un tip special de mitoză este meioza sau diviziunea reducţională, în care nu are loc o diviziune a cromozomilor nucleilor diploizi. În cursul spermatogenezei, spermatocitele sînt transformate în spermatide prin două diviziuni consecutive. Volumul spermatidelor este aproximativ o pătrime din volumul spermatocitelor : la şobolan s-a observat o scădere de la 384 la 117 $\mu^3$ (413).

E n d o m i t o z a constituie reproducerea cromozomilor; este un proces în care diviziunea cromozomilor nu este urmată de diviziunea nucleului şi a celulei. În condiţii normale endomitoza poate urma amitozei; în condiţii patologice poate duce la formarea de nuclei poliploizi. Validitatea creşterii ritmice este menţinută în endomitoză.

## Modificări nucleare volumetrice funcţionale

Caracterul prea rigid al aprecierilor statistic-genetice, după care orice variaţie a volumelor nucleare ar fi rezultatul unei modificări în mărimea şi numărul cromozomilor a fost un handicap serios pentru cariometrie. S-a neglijat aspectul funcţional al modificărilor nucleare, deşi acestea sînt în mare măsură rezultatul fluctuaţiilor permanente ale metabolismului celular. Pe de altă parte, nu trebuie uitat că variaţiile funcţionale ale dimensiunilor nucleare au ca sistem de referinţă volumul nuclear ideal, determinat de numărul de cromozomi. Dealtfel primele observaţii de cariometrie au fost orientate funcţional. Mai tîrziu, între 1925 şi 1946, sub impulsul cercetărilor lui Jacobj au predominat studiile cu caracter descriptiv, comparativ şi genetic. Au existat însă în această perioadă şi publicaţii care au atras atenţia asupra intervenţiei factorilor funcţionali în determinarea mărimii nucleare. În acest sens, Ehrich (152), (153) acordă un rol important cantităţii de lichide intranucleare, iar Biereigel (44), consideră că volumul nuclear este determinat, pe lîngă factorii genetici, de substanţe intracelulare, ca lipide, glicogen şi proteine. Ceva mai tîrziu, Benninghoff (38), (39) creează termenul de „edem nuclear funcţional", Puff (430) introduce ideea de „tumefiere şi retracţie nucleară de cauză funcţională", iar Eichner (154) propune noţiunea de „hipertrofie nucleară de lucru".

În aceeaşi perioadă apar, în ordine cronologică, lucrările experimentale ale lui Salvatore şi Schreiber (465), Krantz (315), (316), (317), Salvatore (463), (464), Lagerstedt (321), Simmenroth (500), Caspersson (76), Bachmann (23), Alfert şi Bern (3), Arnold (15), Boguth şi colab. (50), Puff (430), Macher (353), Altmann (9). Autorii menţionaţi avansează ideea că variaţiile volumului nuclear sînt un indicator important al funcţiilor celulare: hiperfuncţia se însoţeşte de sporirea, hipoactivitatea de diminuarea volumelor nucleare. Coroborarea variaţiilor cantitative volumetrice nucleare cu natura substanţelor intranucleare a permis adîncirea cunoştinţelor de fiziologie şi fiziopatologie celulară la nivel macromolecular.

Scanned with OKEN Scanner

*Volumul nuclear și sinteza proteică.* Numeroase cercetări au dovedit că nu numai cantitatea de ADN determină schimbări ale volumelor nucleare. Relații mai exacte privind metabolismul celular au fost constatate între ARN și proteinele nehistonice, pe de o parte, și volumul nuclear, pe de altă parte. În condiții fiziologice, cantitatea de proteine nonhistonice din celulă variază direct cu volumul nuclear : o creștere a conținutului în proteine atrage o mărire a volumului nuclear ca rezultat al activității celulare sporite (3), (4), (24), (40), (76), (86), (149), (198), (323), (471), (513).

Un rol important în soluționarea acestei probleme au avut măsurătorile nucleare combinate cu cercetările autohistoradiografice. Folosind aminoacizii marcați : leucină, fenilalanină în examene autohistoradiografice, Oehlert și Schultze (397) au constatat că volumele nucleare variază nu numai covariant, dar și proporțional cu activitatea de sinteză a celulei. Mărirea activității celulare se traduce prin accelerarea sintezei proteice ; rata încorporării aminoacizilor devine mai rapidă, masa proteinelor citoplasmatice și, concomitent, volumul nuclear cresc. Citoler și colab. (87) au investigat încorporarea a 12 aminoacizi marcați cu $^{3}H$ și a 5 aminoacizi marcați cu $^{14}C$ în 25 de organe diferite, recoltate de la șobolan și șoarece, stabilind o corelație strînsă între sinteza proteică și mărimea nucleului. Lampert și colab. (326), precum și Vorbrodt (550), în cercetări privind masa uscată, constată o corelație liniară între aceasta și modificările volumului nuclear.

## Regenerarea și volumul nuclear

Un fapt dovedit de mult timp este creșterea volumelor nucleare în cursul regenerării (14), (19), (66), (88), (111), (223), (534). Trebuie însă menționat că, în mărirea volumului nuclear, pe lîngă sporirea activității nucleare, joacă un rol și numeroasele diviziuni celulare. În cursul regenerării apar forme de diviziune care nu se întîlnesc în mod normal în organismul respectiv. Frecvent, în ficatul în regenerare se observă amitoze urmate de apariția de nuclei poliploizi. Ritmul accelerat al diviziunii celulare care conduce la poliploidie crește cantitatea de ADN, ARN și proteine.

## *Modificări nucleare patologice*

Numeroase cauze patologice pot determina modificări ale volumelor nucleare, printre care modificările *toxice celulare* (11), (58), (61), (62), (63), (124), (193), (194), (240), (241), (323), (438), (439), (514), (561), *boala de iradiere* (276), (413), (483), (504), (505), (568), modificările genetice și în special *boala neoplazică* (45), (96), (161), (162), (234), (235), (395).

Sporirea metabolismului celular determină formarea fie de macronuclei, fie de celule multinucleate. Macronucleii apar în marea majoritate prin poliploidie endomitotică. Fenomenul este cu totul pregnant în cancerogeneza hepatică experimentală sau în hepatita virotică. Este de

asemenea posibil ca în celule cu metabolism ridicat, care sînt de obicei mărite ca volum, să intervină o diviziune a macronucleilor, în care caz rezultă gigantocite plurinucleate. În momentul cînd metabolismul celular se normalizează, nucleul poliploid revine la aspectul diploid. În cazul unor leziuni celulare întinse şi brutale, adaptarea nucleară prin endomitoză şi multiplicare nu mai este posibilă, instalîndu-se leziuni nucleare ireversibile, traduse prin picnoză, rexis şi liză.

## *Factori generali afectînd volumul nuclear*

Volumele nucleare sînt departe de a fi constante, oscilînd în jurul unei valori medii. Există variaţii importante, legate de vîrstă, sex, ritmuri biologice.

Creşterea şi dezvoltarea modifică sensibil volumele nucleare (312), (444), (486), (499). Într-o cercetare amplă, Tschahargane (540) constată o diminuare evidentă a volumelor nucleare în stratul bazal al epidermei la subiecţi de peste 60 de ani. Această micşorare a volumului nuclear evoluează paralel cu scăderea conţinutului în acizi nucleici. Dimpotrivă, concentraţia în acizi nucleici rămîne constantă în tot cursul vieţii. În observaţii personale (102), am constatat o scădere marcantă, în raport cu vîrsta, a volumului nucleului neuronal din stratul piramidal intern, precum şi din ganglionii simpatici lombari şi cervicali. Aceste deosebiri ar putea fi puse în legătură pentru cortex cu procesele de atrofie, culminînd cu dispariţia neuronală în senescenţa înaintată. Modificările se pot explica prin tulburări legate de hemodinamică, în special prin ateroscleroză, eventual şi prin alte leziuni lent progresive.

O diminuare a cantităţii de ADN şi ARN paralelă cu vîrsta în nucleii hematiilor a fost pusă în evidenţă la puii de găină în cursul dezvoltării embrionare (163).

Corelaţia dintre vîrstă şi volumul nuclear poate fi înţeleasă numai în lumina concepţiei variaţiilor nucleare funcţionale, dat fiind că ideea unui volum nuclear, determinat exclusiv de un număr rigid de cromozomi, ar atrage volume nucleare invariabile. Reiese totodată că raportul N/P este constant numai în anumite intervale de vîrstă.

Diferenţele de sex sînt reflectate de asemenea în variabilitatea volumelor nucleare. Cele mai evidente modificări apar la nivelul gonadelor, unde volumele nucleare prezintă fluctuaţii, guvernate de ciclul menstrual.

Ritmul diurn sau sezonier imprimă variaţii puternice volumelor nucleare. Caspersson şi Holmgren (77), măsurînd volumele nucleare hepatice la diferite ore din zi, observă diferenţe de 20% între zi şi noapte. Diferenţe similare au fost constatate în celulele nervoase (383), (392), în celulele ependimare (318), (319), în rinichi (64), (65), (309), (310), în insulele Langerhans (243) etc. Mârza şi colab. (361) au constatat un bioritm nictemeral în celulele mucoasei gastrice, care poate fi modificat prin metoda reflexelor condiţionate. Balan şi Araţei (27) confirmă ritmul nictemeral în epiteliul gastroduodenal la şobolan, corelat cu ritmicitatea activităţii peptice şi aciditatea gastrică totală. Diferenţe volumetrice semnificative pot apărea şi în legătură cu ritmul sezonier (71), (105).

Scanned with OKEN Scanner

(134), (309), (310), (316), (334), (492), (510). Ritmul sezonier are o semnificaţie deosebită în special la animalele sălbatice şi vertebratele inferioare, pentru care variaţiile sezoniere reprezintă factori importanţi în influenţarea metabolismului.

Un rol considerabil îl are intervalul scurs între aplicarea unui stimul, indiferent de natura lui, şi reacţia dimensiunilor nucleare. Sadovnikov (461) şi Caspersson (74) observă modificări ale dimensiunilor nucleilor neuronali după 2 ore (respectiv 1 oră) de la acţiunea stimulului. Primele modificări apar la nivelul nucleolului, urmate de reacţia nucleului. La 30 min după administrare de pilocarpină, Stöcker (512) constată cu ajutorul tehnicii autohistoradiografice variaţii ale sintezei proteice şi ale volumelor nucleare în celulele pancreatice. Modificări volumetrice nucleare au fost stabilite în tiroidă la o oră după administrare de tiouracil (408) şi în zona fasciculată a suprarenalei la 30 min după injectare de hidrocortizon (415), (506). Tratamentul cu adrenalină atrage în 10 min o scădere a volumului nuclear cu 26% în celulele medulosuprarenalei. În celulele organului Corti de la animalele sacrificate la 5 min după o excitaţie auditivă, Hartendorf şi colab. (230) găsesc creşteri ale volumelor nucleare cu 40%. Reiese de aici că momentul examinării nucleilor poate fi decisiv, întrucît, dacă efectul stimulului a trecut sau n-a atins maximul, reactivitatea nucleară rămîne insesizabilă. În cariometria modernă este absolut necesar, pentru compararea rezultatelor, ca animalele să fie sacrificate la intervale precise după acţiunea stimulului. Modificările observate în raport cu timpul pot fi exprimate procentual ca deviaţii de la populaţia de control sau ca diferenţe ale logvolumelor populaţiei tratate sau de control. Diferitele tipuri celulare reacţionează variabil la diverse influenţe. În funcţie de dependenţa de timp se poate vorbi de tipuri celulare pozitiv bifazice, negativ bifazice şi monofazice. Denumim reacţie bifazică negativă la un anumit stimul tipul de reacţie la care direcţia este opusă la început celei aşteptate; mai tîrziu reacţia se îndreaptă în sensul urmărit. În reacţia bifazică pozitivă modificarea este de la început în direcţia stimulului; după ce atinge maximul, curba prezintă un sens invers fazei iniţiale. Volumele nucleare pot astfel creşte sau diminua în funcţie de natura influenţei stimulatorie sau inhibitorie. În acest sens, celulele pot fi denumite pozitiv sau negativ bifazice, după cum curbele cariometrice prezintă un caracter pozitiv sau negativ bifazic.

În cazul celulelor exocrine negativ bifazice, acţiunile care conduc la depleţia celulară atrag o diminuare şi apoi o sporire a volumului nuclear. Volumul nuclear nu este strict paralel cu cantitatea de secreţie celulară: odată cu eliminarea secreţiei, celulele pierd apă; în vederea păstrării echilibrului osmotic, volumul nuclear diminuează în prima fază. Eliminarea secreţiei constituie un stimul pentru sporirea activităţii celulare: sinteza proteică creşte (512), iar volumul nuclear se măreşte. Sinteza proteică este însoţită de aflux de lichide, ceea ce atrage tumefierea nucleului şi, ulterior, a întregii celule. După un timp, atunci cînd sinteza proteică şi elaborarea secreţiei ating nivelul de bază, volumul nuclear prezintă valoarea originară. Dacă celulele secretorii sînt supuse unei influenţe durabile, curba cariometrică îşi pierde caracterul bifazic, deoarece stimulul următor acţionează înainte ca celula să fi ajuns în faza de repaus. Evacuarea celulei are loc în perioada de activitate mărită, determinată de stimulul



Scanned with OKEN Scanner

precedent. Sub acţiunea stimulilor repetaţi, activitatea celulară, deci şi volumul nuclear, cresc. Această activitate nu poate însă depăşi un anumit nivel, iar creşterea volumelor nucleare este limitată nu numai de funcţionalitatea celulei, ci şi de homeostazia organismului. De îndată ce stimulul încetează, celulele revin la nivelul funcţional de bază. Această etapă constituie faza a doua a curbei cariometrice. Valoarea iniţială este atinsă după mai multe fluctuaţii, a căror amplitudine este cuprinsă în deviaţia standard a volumelor nucleare. Aspectul pozitiv bifazic, cunoscut şi ca fenomen de „rebound" sau „escape" se întîlneşte foarte pregnant la celulele endocrine.

Curbele de reacţie monofazică se constată în celulele nesecretante sau la cele cu reactivitate scăzută. În condiţii fiziologice, volumele nucleare variază direct cu intensitatea şi durabilitatea acţiunii. Cu cît această influenţă este mai mare, cu atît modificările metabolice, traduse prin sporirea volumului nuclear, sînt mai accentuate. În cazul stimulilor repetaţi la intervale mai scurte decît timpul de revenire al celulei, efectele stimulatorii cumulează, iar rezultatul este o curbă permanent ascendentă, caracteristică sindroamelor de hiperfuncţie. Curbele corelative timp — volume nucleare pot fi extrem de utile în elucidarea sediilor de acţiune a diferitelor substanţe sau în stabilirea controlului ierarhic al grupelor celulare sau organelor.

Scanned with OKEN Scanner

# 2. Cariocitometria

## Metode de măsurare a volumului nuclear

Cariocitometria este metoda prin care se apreciază cantitativ unele aspecte morfologice, urmărite dinamic. Această exprimare tinde să înlocuiască expresii ca „neliniște nucleară", „neliniște celulară" și traduce mai exact remanieri calitative, constructive și destructive, fiind deci un test mai sensibil al plasticității adaptative cito-tisulare dependentă de numeroși factori, atît în condiții normale (embriogeneză, maturare, ciclu funcțional, variații de specie), cît și patologice (distrofii, displazii, tumorigeneză).

Metoda cariocitometrică a fost între timp amplificată prin cercetări cantitative de citofotometrie și autohistoradiografie, care i-au lărgit considerabil orizontul științific. Microscopia electronică a beneficiat de asemenea de aportul cariocitometriei. S-au dimensionat mitocondriile în diverse condiții experimentale (25), (90), (279), (347), (416), suprafața reticulului endoplasmic și a membranelor (554).

Relativ recent, o dovadă asupra utilității practice a cariometriei o reprezintă lucrările lui Foraker și Reagan (181), care au contribuit, prin determinări biometrice, la aprofundarea noțiunii de precancer.

În țara noastră, cariocitometria are o tradiție îndelungată. În 1901, Marinescu (358) semnalează variații volumetrice ale neuronilor motori în diferite condiții experimentale. Cercetări interesante de cariocitometrie au fost dezvoltate de Milcu, Crăciun, Mârza, Repciuc, Săhleanu. Numeroase lucrări de cariometrie efectuate de școala de histologie de la Iași condusă de Mârza au extins considerabil limitele cito-fiziologiei și cito-fiziopatologiei cantitative.

În observațiile noastre am utilizat, pe lîngă mărimea nucleului, noțiunea de „distanță internucleară", propusă de Crăciun (97) și utilizată și de Repciuc în 1960, în locul noțiunii „mărimea celulei", ca un parametru care aduce dovezi indirecte pentru aprecierea raportului nucleo-plasmatic. Principalul motiv este că în felul acesta se ține seama de ambianța tisulară, dat fiind că celulele, ierarhizate în complexe, sînt în interacțiune permanentă cu factorii tisulari.

Mărimea nucleului poate fi exprimată sub formă de diametre, suprafață sau volum. Forma sferică apare relativ rar, majoritatea nucleilor luînd aspectul unui elipsoid de revoluție, cu o elongație mai mult sau mai puțin pronunțată.

În unele observații de cariometrie, nucleii au fost caracterizați prin măsurarea ambelor diametre și calcularea mediei. Unele publicații consideră volumul nuclear ca o sferă. După Möricke (384) aprecierea

Scanned with OKEN Scanner

volumelor nucleare ca fiind sferice prezintă o acurateţe acceptabilă numai cînd diferenţa dintre axe nu depăşeşte 14%, adică o elongaţie de 1,14.

Rezultă că cel mai bun procedeu de estimare cantitativă a nucleilor este de a calcula volumele nucleare, considerîndu-le ca elipsoide de revoluţie.

Tehnicile de măsurare pot fi efectuate după două modalităţi: măsurători directe; tehnici de microproiecţie.

## Măsurători directe

*Micrometrul ocular* a fost folosit încă de la începutul cercetărilor cariometrice (fig. 1). Diviziunile micrometrice sînt transformate în microni, folosind grosismentul maxim. Se dimensionează cele două diametre nucleare, dispunînd micrometrul paralel cu unul din diametre şi apoi perpendicular pe acesta pentru dimensionarea celuilalt diametru. Metoda consumă mult timp, iar rezultatele trebuie îndelung verificate spre a evita erori care se multiplică în calcularea volumelor. Printr-o practică

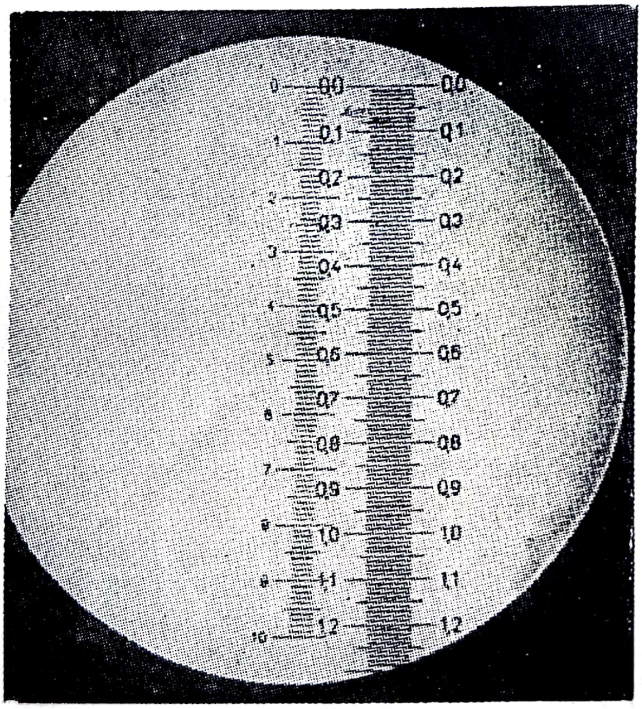



Fig. 1. — Micrometrul ocular proiectat pe lama gravată, situată pe platină în vederea etalonării microscopului.

îndelungată se pot însă obţine date superpozabile altor metode moderne. Are avantajul că, necesitînd o aparatură extrem de simplă şi puţin costisitoare, poate fi folosită în orice laborator de morfologie. Pentru sondarea dinamicii unei anume populaţii nucleare, comparaţii între etape de experiment sau momente de evoluţie în cursul bolii, tehnica aduce reale ser-

Scanned with OKEN Scanner

vicii. Pentru cei care folosesc încă micrometrul ocular, o facilitare o constituie tabela lui Arnold (15) (tabelul nr. 1).

*Microplanimetrul* se compune dintr-o lentilă cu două filamente perpendiculare, montată în tubul microscopului, legată printr-o bară cu planimetrul. Firele perpendiculare proiectate pe imaginea microscopică sînt astfel manevrate încît să acopere un punct pe conturul nucleului. Lentila poate fi deplasată prin mişcările planimetrului; punctul de intersecţie al firelor perpendiculare se mişcă de-a lungul nucleului, rezultînd suprafaţa nucleară pe care o trasează planimetrul.

*Pantograful* ocupă o poziţie intermediară între măsurătorile microscopice directe şi tehnicile de microproiecţie. În locul planimetrului se deplasează un braţ inscriptor care trasează conturul nuclear pe o foaie de hîrtie, plasată în afara microscopului. Ambele diametre şi suprafaţa pot fi măsurate pe hîrtie. Un dezavantaj constă în faptul că măsurătorile se fac lent.

## Metode de microproiecţie

Aceste metode constau în proiecţia imaginii microscopice şi măsurarea ariei nucleare din imaginea proiectată. Proiecţia are loc cu ajutorul unei oglinzi sau al unei prisme.

Dimensionările imaginii proiectate se pot efectua direct sau indirect. În primul procedeu măsurătorile sînt efectuate direct pe imaginea proiectată. În metoda indirectă, conturul nucleilor se trasează pe hîrtie, după care se pot calcula cu uşurinţă suprafaţa şi volumul nuclear. Ambele metode au avantaje şi dezavantaje. Metoda indirectă are avantajul că, forma nucleilor fiind fixată pe desen, calculele pot fi repetate. Prezintă însă riscul erorilor introduse prin desen şi consumă mult timp. În ţara noastră, planimetria a fost amplu utilizată în numeroase lucrări de către şcoala de morfologie de la Iaşi condusă de Mârza. Procedeul direct necesită aparatură costisitoare, dar prezintă marele avantaj al automatizării.

Menţionăm în treacăt procedeul Dontenwill (141), constînd din desenarea nucleilor pe hîrtie cu greutate uniformă, decuparea contururilor nucleare şi cîntărirea acestora pe o balanţă analitică. Modificările volumetrice sînt exprimate ca modificări în greutate. Metoda este însă lentă şi cu un grad relativ mare de eroare.

Un rol important îl are grosismentul la care se efectuează măsurătorile. Într-adevăr, la măritor slab, eroarea măsurătorilor este mai mare. Pe de altă parte, la grosismentele excesiv de mari, conturul nuclear devine neclar, ceea ce atrage erori de apreciere dimensiunilor. Efectuînd numărători nucleare la diferite mărimi ale imaginii proiectate, începînd cu 1 000 × şi crescînd în trepte succesive pînă la 3 500×, Palkovits şi Fischer (414) observă o eroare de peste 15% la mărirea de 1 000 ×, în timp ce la 2 000 × eroarea scade sub 5%.

Scanned with OKEN Scanner

*Tabelul*

**Calcularea volumului nuclear (în $\mu^3$)**

| | 4 | 4,2 | 4,4 | 4,6 | 4,8 | 5 | 5,2 | 5,4 | 5,6 | 5,8 | 6 | 6,2 | 6,4 | 6,6 | 6,8 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 33,5 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4,2 | 35,2 | 38,8 | | | | | | | | | | | | | | |
| 4,4 | 36,9 | 40,6 | 44,6 | | | | | | | | | | | | | |
| 4,6 | 38,5 | 42,5 | 46,6 | 51,0 | | | | | | | | | | | | |
| 4,8 | 40,2 | 44,3 | 48,7 | 53,2 | 57,9 | | | | | | | | | | | |
| 5 | 41,9 | 46,2 | 50,7 | 55,4 | 60,3 | 65,5 | | | | | | | | | | |
| 5,2 | 43,6 | 48,0 | 52,7 | 57,6 | 62,7 | 68,1 | 73,6 | | | | | | | | | |
| 5,4 | 45,2 | 49,9 | 54,7 | 59,8 | 65,1 | 70,7 | 76,5 | 82,4 | | | | | | | | |
| 5,6 | 46,9 | 51,7 | 56,8 | 62,0 | 67,6 | 73,3 | 79,3 | 85,5 | 92,0 | | | | | | | |
| 5,8 | 48,6 | 53,6 | 58,8 | 64,3 | 70,0 | 75,9 | 82,1 | 88,6 | 95,2 | 102 | | | | | | |
| 6 | 50,3 | 55,4 | 60,8 | 66,5 | 72,4 | 78,5 | 84,9 | 91,6 | 98,5 | 106 | 113 | | | | | |
| 6,2 | 51,9 | 57,3 | 62,8 | 68,7 | 74,8 | 81,2 | 87,8 | 94,7 | 102 | 109 | 117 | 125 | | | | |
| 6,4 | 53,6 | 59,1 | 64,9 | 70,9 | 77,2 | 83,8 | 90,6 | 97,7 | 105 | 113 | 121 | 129 | 137 | | | |
| 6,6 | 55,3 | 61,0 | 66,9 | 73,1 | 79,6 | 86,4 | 93,4 | 101 | 108 | 116 | 124 | 133 | 142 | 151 | | |
| 6,8 | 57,0 | 62,8 | 68,9 | 75,3 | 82,0 | 89,0 | 96,3 | 104 | 112 | 120 | 128 | 137 | 146 | 155 | 165 | |
| 7 | 58,6 | 64,7 | 71,0 | 77,6 | 84,4 | 91,6 | 99,1 | 107 | 115 | 123 | 132 | 141 | 150 | 160 | 169 | 180 |
| 7,2 | 60,3 | 66,5 | 73,0 | 79,8 | 86,9 | 94,2 | 102 | 110 | 118 | 127 | 136 | 145 | 154 | 164 | 174 | 195 |
| 7,4 | 62,0 | 68,3 | 75,0 | 82,0 | 89,3 | 96,9 | 105 | 113 | 122 | 130 | 139 | 149 | 159 | 169 | 179 | 190 |
| 7,6 | 63,7 | 70,2 | 77,0 | 84,2 | 91,7 | 99,5 | 108 | 116 | 125 | 134 | 143 | 153 | 163 | 173 | 184 | 195 |
| 7,8 | 65,3 | 72,0 | 79,1 | 86,4 | 94,1 | 102 | 110 | 119 | 128 | 137 | 147 | 157 | 167 | 178 | 189 | 200 |
| 8 | 67,0 | 73,9 | 81,1 | 88,6 | 96,5 | 105 | 113 | 122 | 131 | 141 | 151 | 161 | 172 | 182 | 194 | 215 |
| 8,2 | 68,7 | 75,7 | 83,1 | 90,9 | 98,9 | 107 | 116 | 125 | 135 | 144 | 155 | 165 | 176 | 187 | 199 | 210 |
| 8,4 | 70,4 | 77,6 | 85,2 | 93,1 | 101 | 110 | 119 | 128 | 138 | 148 | 158 | 169 | 180 | 192 | 203 | 226 |
| 8,6 | 72,0 | 79,4 | 87,2 | 95,3 | 104 | 113 | 122 | 131 | 141 | 151 | 162 | 173 | 184 | 196 | 208 | 221 |
| 8,8 | 73,7 | 81,3 | 89,2 | 97,5 | 106 | 115 | 125 | 134 | 144 | 155 | 166 | 177 | 189 | 201 | 213 | 236 |
| 9 | 75,4 | 83,1 | 91,2 | 99,7 | 109 | 118 | 127 | 137 | 148 | 159 | 170 | 181 | 193 | 205 | 218 | 231 |
| 9,2 | 77,1 | 85,0 | 93,3 | 102 | 111 | 120 | 130 | 140 | 151 | 162 | 173 | 185 | 197 | 210 | 223 | 246 |
| 9,4 | 78,8 | 86,8 | 95,3 | 104 | 113 | 123 | 133 | 144 | 154 | 166 | 177 | 189 | 202 | 214 | 228 | 281 |
| 9,6 | 80,4 | 88,7 | 97,3 | 106 | 116 | 126 | 136 | 147 | 158 | 169 | 181 | 193 | 206 | 219 | 232 | 246 |
| 9,8 | 82,1 | 90,5 | 99,3 | 109 | 118 | 128 | 139 | 150 | 161 | 173 | 185 | 197 | 210 | 224 | 237 | 251 |
| 10 | 83,8 | 92,4 | 101 | 111 | 121 | 131 | 142 | 153 | 164 | 176 | 188 | 201 | 214 | 228 | 242 | 257 |
| | 4 | 4,2 | 4,4 | 4,6 | 4,8 | 5 | 5,2 | 5,4 | 5,6 | 5,8 | 6 | 6,2 | 6,4 | 6,6 | 6,8 | 7 |

## Instrumente automate și semiautomate de măsurare

Datorită neomogenității materialului în secțiunile histologice o automatizare completă este impracticabilă. Mult mai ușor de rezolvat este computerizarea datelor rezultate prin dimensionări. În acest sens au fost construite aparate cu eficiență variată. Menționăm dintre acestea următoarele :

*Înregistratorul Eichner (155) cu folie dimensionată* utilizează o folie gravată cu semne în cruce de diferite mărimi, dispusă în ordinea de mărime a claselor de logvolume nucleare care se proiectează pe imaginea microscopică. Nucleul pe care-l măsurăm este făcut să coincidă cu crucea de dimensiuni apropiate. Metoda este destul de lentă, iar aprecirea nu este foarte exactă.

Scanned with OKEN Scanner

*nr. 1*

**după formula $V = \frac{\pi}{6} LB^2$ (după Arnold (15))**

| 7,2 | 7,4 | 7,6 | 7,8 | 8 | 8,2 | 8,4 | 8,6 | 8,8 | 9 | 9,2 | 9,4 | 9,6 | 9,8 | 10 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | | | | 4 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 4,2 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 4,4 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 4,6 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 4,8 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 5 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 5,2 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 5,4 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 5,6 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 5,8 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 6 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 6,2 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 6,4 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 6,6 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 6,8 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 7 |
| 198 | | | | | | | | | | | | | | | 7,2 |
| 201 | 212 | | | | | | | | | | | | | | 7,4 |
| 206 | 218 | 230 | | | | | | | | | | | | | 7,6 |
| 212 | 224 | 236 | 248 | | | | | | | | | | | | 7,8 |
| 217 | 229 | 242 | 255 | 268 | | | | | | | | | | | 8 |
| 223 | 235 | 248 | 261 | 275 | 289 | | | | | | | | | | 8,2 |
| 228 | 241 | 254 | 268 | 281 | 296 | 310 | | | | | | | | | 8,4 |
| 233 | 247 | 260 | 274 | 288 | 303 | 318 | 333 | | | | | | | | 8,6 |
| 239 | 252 | 266 | 280 | 295 | 310 | 325 | 341 | 357 | | | | | | | 8,8 |
| 244 | 258 | 272 | 287 | 302 | 317 | 333 | 349 | 365 | 382 | | | | | | 9 |
| 250 | 264 | 278 | 293 | 308 | 324 | 340 | 356 | 373 | 390 | 408 | | | | | 9,2 |
| 255 | 270 | 284 | 299 | 315 | 331 | 347 | 364 | 381 | 399 | 417 | 435 | | | | 9,4 |
| 261 | 275 | 290 | 306 | 322 | 338 | 355 | 372 | 389 | 407 | 425 | 444 | 463 | | | 9,6 |
| 266 | 281 | 296 | 313 | 328 | 345 | 362 | 380 | 397 | 416 | 434 | 453 | 473 | 493 | | 9,8 |
| 271 | 287 | 302 | 319 | 335 | 352 | 369 | 387 | 405 | 424 | 443 | 463 | 483 | 503 | 524 | 10 |
| 7,2 | 7,4 | 7,6 | 7,8 | 8 | 8,2 | 8,4 | 8,6 | 8,8 | 9 | 9,2 | 9,4 | 9,6 | 9,8 | 10 | |

*Microplanimetrul înregistrator* (Caspersson şi colab. (79), (80)) se bazează pe deplasarea angulară a planimetrului manual care este transferată unui curent de intensitate cunoscută, mişcînd braţul înregistrator al aparatului. Diferitele intensităţi ale curentului determină deviaţii ale braţului înregistrator, care se însumează sub forma unei curbe.

*Analizatorul de particule* permite măsurători pe negativul fotografic al imaginii microscopice. Negativul este iluminat de jos în sus, diametrul fasciculului luminos putînd fi modificat cu ajutorul unui diafragm. Nucleul care urmează să fie măsurat este adus în dreptul fasciculului luminos şi prin manevrarea diafragmului se echivalează diametrul fasciculului cu diametrul nucleului. Aparatul estimează nucleii ca fiind sferici. Diafragmul este conectat cu un mecanism de calcul, care înregistrează automat valoarea suprafeţei. Totodată se efectuează o clasificare automată a valorilor dimensionale ale nucleilor (167).

Scanned with OKEN Scanner

*Aparatul de microproiecţie semiautomată* (Palkovits şi Csapó (410)) proiectează imaginea micşorată de jos în sus pe un geam mat. Puterea de mărire a dispozitivului de proiecţie este de 3 000×. Diametrele se măsoară cu o riglă. Cu ajutorul tabelelor imaginate de Fischer şi Inke (178) se află imediat logvolumul nucleului. Aparatul posedă şi un dispozitiv de calcul, care grupează volumele nucleare în clase, dînd şi numărul total de nuclei măsuraţi, precum şi distribuţia mărimilor nucleare în cariograme.

*Metodele cu „scanning"* se bazează pe descompunerea obiectului în benzi paralele, lungimea totală a benzilor reprezentînd mărimea obiectului. Un circuit integrativ stabileşte mărimea particulelor rezultate din amplitudinea lungimilor de undă şi efectuează distribuţia în clase. Dintre aparatele care folosesc procedee „scanning" amintim : microscopul de interferenţă, descris la capitolul de interferenţă, şi microspectrofotometrul universal (UMSP I), ale cărui utilizări sînt discutate la capitolul de citofotometrie.

## *Calcularea volumului nuclear*

În secţiuni histologice nucleii apar cel mai frecvent ca elipsoide. Aşa cum se ştie, acestea sînt solide ale căror planuri de secţiune sînt elipse. Elipsoidul este simetric faţă de cele trei axe reciproc perpendiculare, fiecare avînd o lungime diferită, notate A, B, C în ordine descrescîndă. Un elipsoid poate fi considerat o sferă deformată în două sau trei direcţii. Volumul sferei fiind $V = \frac{\pi}{6} D^3$ (D = diametrul), avem pentru volumul elipsoidului triaxial :

$$V = \frac{\pi}{6} ABC \text{ (A, B, C fiind axele elipsoidului).}$$

Elipsele, observate în secţiunile histologice, se definesc prin doi parametri (cele două axe), în timp ce reconstrucţia elipsoidului, prezumat a corespunde formei nucleului, necesită trei axe (A, B, C). Problema poate fi rezolvată fie măsurînd al treilea diametru perpendicular pe secţiune, problemă dificilă atît ca principiu cît şi ca tehnică, fie prezumînd unele date privind proporţiile elipsoidului, de exemplu că diametrul mic este constant sau reprezintă o funcţie liniară a mediei geometrice a axei mari şi a celei medii.

Rezultă că foarte des nu avem altă soluţie decît să considerăm nucleii ca elipsoide cu doi parametri, şi anume ca sferoide sau elipsoide de revoluţie, generate prin rotaţia elipsei în jurul uneia din axe. Altfel exprimat, un sferoid poate fi considerat o sferă tracţionată proporţional într-o direcţie. Volumul sferoidului se poate exprima prin formula :

$$V = \frac{\pi}{6} LB^2 \text{ (L şi B fiind axele elipsei).}$$

În cazul investigării nucleilor sferoidali este util să se ţină seama de coeficientul de elongaţie : $E = \frac{L}{B}$, care se poate exprima şi ca un singur număr. De exemplu, dacă axa mare este de 2,3 × mai mare decît axa mică, elongaţia poate fi redată ca 2,3.

Scanned with OKEN Scanner

*Alegerea formulelor pentru calculul volumului nuclear*

În practica noastră folosim pentru nucleii sferici sau aproape sferici (cu elongaţie pînă la 1,2) formula :

$$V = \frac{\pi}{6} D^3,$$

iar pentru nucleii cu elongaţie între 1,2 şi 2, formula :

$$V = \frac{\pi}{6} LB^2.$$

Datele numerice obţinute prin dimensionarea celulelor, nucleilor, nucleolilor sînt prezentate în histograme, ca frecvenţe relative ale claselor respective. Una dintre proprietăţile cele mai evidente ale curbelor cariometrice este simetria sau lipsa simetriei. În cazul cînd curba densităţii unei populaţii este asimetrică, trebuie făcută simetrică spre a deveni accesibilă metodelor statistice. Acesta este şi scopul transformării logaritmice. Există numeroase metode pentru estimarea simetriei ; un procedeu frecvent utilizat este cubul deviaţiei standard.

O proprietate a distribuţiilor mai greu de observat cu ochiul liber este excesul sau curtoza. În cariometrie se întîlnesc adesea curbe turtite, cu o curtoză mai mică decît normalul, ceea ce poate sugera prezenţa a două (sau mai multe) tipuri nucleare.

Îngustimea sau lărgimea unei distribuţii, apreciată prin deviaţia standard, este un criteriu important de evaluare. O creştere a deviaţiei standard indică o influenţă mărită a factorilor aleatorii. Deviaţiile varianţei, adică o creştere sau o scădere a stabilităţii, pot fi observate direct.

Pluralitatea maximelor indică heterogeneitatea populaţiei nucleare corelată cu faze funcţionale, poliploidie etc. Se impune în aceste cazuri determinarea probabilităţii pentru fiecare tip nuclear. Printre metodele matematice utilizate pentru descompunerea unei distribuţii în componente gaussiene amintim procedeele lui Medgyessi (366), precum şi algoritmul lui Gregor (214).

În scopul caracterizării simultane a simetriei mai multor variabile se folosesc cvartilele.

Interrelaţia dintre variabile corelate printr-o anume cauzalitate este apreciată prin analiza de corelaţie şi de regresiune.

Problema extrem de complexă a influenţei pe care o au forma şi aranjamentul spaţial al nucleilor asupra evaluării volumelor nucleare a fost de mult timp în atenţia cercetătorilor. Fundamentări matematice competente au fost aduse de Hofmann (274), Lodin şi colab. (344), Palkovits şi Fischer (414), Repciuc şi colab. (440), (441), Scharf (481), Scharf şi colab. (482).

Scanned with OKEN Scanner

## *Efectul tehnicilor histologice curente în cariocitometrie*

Este un fapt de mult stabilit că volumele nucleare şi citoplasmice sînt modificate prin tehnicile histologice. Modificarea constă în apariţia retracţiilor nucleo-citoplasmatice în proporţie de 10—70%. Dat fiind faptul că tehnicile histologice produc modificări în diferite proporţii, este necesar, pentru compararea rezultatelor, să se utilizeze numai material prelucrat similar.

### Efectul fixării

Fixatorii determină, în funcţie de compoziţie, grade variabile de retracţii nucleare. Acelaşi fixator poate avea efecte diferite legate de modul, durata şi temperatura la care a fost aplicat (4), (77), (132), (165), (171), (280), (569). Datele concordă în privinţa faptului că alcoolul 80% produce o retracţie de 10—32%, în timp ce la formol retracţia este de 45—71%. Dintre fixatorii uzuali, Wüstenfeld (569) găseşte o retracţie mică după Bouin, iar Inke şi colab. (280) după fixatorul Mayer. O retracţie minimă a fost observată de Diefenbach şi Federlin (132) după fixarea în tetroxid de osmiu. Ceea ce contează în realitate este nu retracţia minimă, ci retracţia care se repetă mereu identic. De aici concluzia că sînt de dorit fixatori care produc o retracţie uniformă, chiar dacă aceasta este relativ mare (132).

Gradul de retracţie a nucleului şi citoplasmei este diferit. După Wüstenfeld (569) retracţia citoplasmei este mai mare cu 11% faţă de a nucleului. Alcoolul are un efect de retracţie predominant citoplasmic, în timp ce lichidele Bouin şi Zenker exercită în special o retracţie nucleară.

Ţinînd seama că volumele nucleare în secţiuni la congelaţie pot fi considerate practic egale cu cele din ţesuturile vii, Palkovits şi colab. (413) au studiat efectul fixatorilor pe secţiunile congelate, evitînd includerea la parafină, care ea însăşi are un puternic efect de retracţie (254). Dintre cei 24 de fixatori urmăriţi, lichidele Apathy, Mayer, Zenker şi Bouin, alcoolul 80% şi formolul 4—8% produc retracţii minime. Dimpotrivă, fixatorii Helly, Carnoy şi Gilson atrag retracţii importante.

Un rol major îl are procedeul de fixare. De exemplu în cazul imersării într-un lichid fixator nucleii de pe partea imersată sînt mai retractaţi decît cei din partea opusă, diferenţele putînd atinge 70%. Concluzia este că trebuie evitată cariometria zonelor superficiale ale ţesuturilor, în afară de cazul cînd toţi nucleii care urmează să fie măsuraţi sînt situaţi în această zonă, de exemplu în glomerulara suprarenalei. Rezultate optime se obţin prin fixarea intravasculară.

Materialul pentru studii cariometrice trebuie fixat cît mai repede posibil, deoarece autoliza şi uscarea piesei atrag modificări importante. După Wüstenfeld (569), la o fixare după 4 ore de la prelevarea fragmentului, volumul nuclear mediu prezintă o diferenţă de 6%; la 24 de ore, diferenţa este de 27% faţă de materialul fixat imediat. Cercetările lui Inke şi colab. (280) au arătat că, în ţesuturile fixate variat ca durată de timp, volumele

Scanned with OKEN Scanner

nucleare diferă. De exemplu, în a 7-a zi de fixare în formol, retracția nucleară face loc unei tumefieri.

Retracția nucleară este cu 18% mai mare la nucleii fixați în termostat la 56°C în comparație cu fixarea la temperatura camerei. Congelarea la temperaturi foarte joase atrage o retracție marcantă (132), (171).

## Efectul includerii

Includerea continuă acțiunea de retracție nucleară începută de fixator. Retracția produsă de includerea în parafină diferă în funcție de fixatorul utilizat : 22—38% după Bouin, 30—50% după Zenker, 38—55% după formol (255). Comparînd țesuturile incluse cu secțiunile la congelație, identic fixate, se constată că volumul nuclear este mai puțin retractat la parafină (10%), ceva mai mult la celoidină (18%) și puternic la celoidină-parafină (46%). Deși includerea în celoidină-parafină determină retracția cea mai mare, este totuși de preferat din cauza omogenității volumelor nucleare. Între volumele nucleare ale zonelor periferice și centrale apare în cazul includerii la parafină o diferență de 70%, pe cînd în includerea a celoidină-parafină, diferența este de nu mai 35%.

## Rolul secționării în măsurătorile cariocitometrice

Rezultatele măsurătorilor pot fi influențate de grosimea secțiunii și de înclinarea planului de secțiune. După cei mai mulți autori grosimea optimă a secțiunilor este de 1,5—2 × diametrul nuclear. Orientarea secțiunilor depinde de forma și dispunerea spațială a nucleilor.

## Efectul colorării

Colorarea nucleilor are nu numai rolul de a-i face vizibili, ci și de a contribui la creșterea contrastului între nuclei și țesutul din jur. După Wüstenfeld (569) volumele nucleare cresc prin colorare. Această creștere este de 28,7% pentru azan, 41,1% pentru hematoxilină ferică, 21,6% pentru hematoxilină eozină. Din aceste observații reiese că pentru compararea rezultatelor trebuie să se utilizeze numai țesuturi colorate identic.

Scanned with OKEN Scanner

# 3. Citofotometria

## Principiile metodei citofotometrice

Principiul metodelor citofotometrice se bazează pe măsurarea absorbției radiațiilor electromagnetice în obiectele biologice. Pentru aceasta se folosesc proprietățile cromoforelor, de exemplu dublele legături în acizii nucleici sau absorbția substanțelor colorante, legate specific și stoichiometric.

În tabelul nr. 2 sînt redate scala lungimilor de undă și metodele aplicate pentru diferitele regiuni ale spectrului electromagnetic. Din tabel rezultă că există diferite căi de a determina substanțele chimice intracelulare. Dealtfel este de subliniat necesitatea de a urmări prin tehnici variate și complimentare prezența constituenților intracelulari sau intracitoplasmatici, reclamată de însăși compoziția chimică complexă a nucleului și a citoplasmei (tabelul nr. 3).

Acizii nucleici pot fi estimați atît în lumina ultravioletă la 260 mμ cît și în colorațiile Feulgen sau galocianin-cromalaun. Pentru evidențierea histonelor se practică colorația cu fast-green la pH 8,2 sau cu metafosfat-galocianin-cromalaun. Proteinele nehistonice pot fi vizualizate prin reacția Millon sau prin reacții de identificare a grupării $NH_2$.

Dintre tehnicile citofotometrice, o utilizare largă o are microfotometria guvernată de aceleași legi ca și spectrofotometria. În microfotometrie, microscopul înlocuiește cuva cu soluție, iar fotometrarea se execută pe imaginea proiectată a celulei (fig. 2).

Datele obținute în microfotometrie privesc: 1) masa sau concentrația unei substanțe; 2) identificarea substanțelor în celulă.

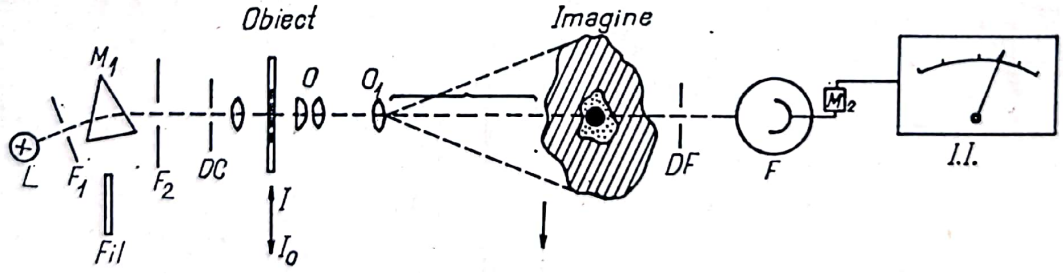



Fig. 2. — Schema citofotometrului. *L*, Sursa de lumină; $F_1$, fanta de intrare în monocromator; *Fil*, filtru; $F_2$, fanta de ieșire din monocromator; *DC*, diafragma condensatorului; $I_0$, cuvă cu soluție, respectiv blanc în preparatul histologic; *I*, cuvă cu substanța de măsurat, respectiv punct de măsurat în celulă; *O*, obiectiv; $O_1$, ocular; *DF*, diafragma fotometrului,; *F*, celulă fotoelectrică; $M_1$, monocromator; $M_2$, multiplicator; *I.I.*, instrument indicator.

Scanned with OKEN Scanner

*Tabelul nr. 2*

**Scala lungimilor de undă corelată cu metoda de histochimie cantitativă (după Sandritter (467))**

| Zona de radiaţii | mμ | Substanţa | Reacţia de culoare | Metoda |
|---|---|---|---|---|
| Infraroşu | 1 000 | ARN, ADN, carbohidraţi | — | microfotometrie în infraroşu |
| Infraroşu | 800 | lipide, proteine | — | microfotometrie în infraroşu |
| Vizibil | 700 | ADN | Feulgen, galocianin-cromalaun-RN-ază, fluorescenţă | citofotometrie |
| Vizibil | | ARN | galocianin-cromalaun, azur B | citofotometrie |
| Vizibil | | histone | fast-green pH 8,2, meta-fosfat-galocianin-cromalaun | citofotometrie |
| Vizibil | | arginină | desaminare, Sakaguchi | citofotometrie |
| | | | (determinarea greutăţii uscate) | microscopie de interferenţă |
| Vizibil | | tirozină, triptofan | Millon | citofotometrie |
| Vizibil | | $NH_2$ (proteine) | fast-green pH 8,2 naftol-galben S | citofotometrie |
| Vizibil | | SS + SH | Bahr | citofotometrie |
| Vizibil | 500 | carbohidraţi | PAS | citofotometrie |
| Vizibil | 400 | hemoglobină | pigmenţi, Fe(III), lipofuscină, DPN — DPNH, enzime respiratorii | citofotometrie |
| UV | 300 | tirozină, triptofan | — | microfotometrie în UV |
| UV | 200 | acizi nucleici | — | microfotometrie |
| Vacuum UV | 10 | — | — | — |
| Raze X | 1 | determinarea greutăţii uscate | | microradiografie cu raze X |
| Raze X | 0,1 | Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Ag, I etc. | | histospectroscopie cu raze X |
| Microscopie electronică | | determinarea greutăţii uscate | | Bahr |

Masa şi concentraţia sînt măsurate în maximul de absorbţie al substanţei la o anumită lungime de undă. Dacă se urmăreşte exclusiv concentraţia, se măsoară numai extincţia. În determinările de masă se multiplică extincţia cu suprafaţa.

Orice determinare a absorbţiei luminii implică două măsurători: intensitatea luminii incidente ($I_0$) şi intensitatea luminii după ce a trecut prin obiectul biologic ($I_1$). Lumina transmisă de către obiect ($I_1/I_0$) este transmisia (T), care variază de la 0 pentru obiectele opace la 1,0 pentru cele complet transparente. Absorbţia luminii fiind un fenomen molecular,

Scanned with OKEN Scanner

*Tabelul nr. 3*

**Compoziția chimică a nucleului și diferitele metode de citochimie cantitativă (după Sandritter (467))**

| Substanțe | Metodă | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | fotometrie în UV mμ | fotometrie în vizibil | microscopie de interferență | historadiografie cu raze X | autoradiografie |
| ADN | 260 | Feulgen, galocianin-cromalaun, verde metil | extracție DN-ază | — | $^{3}$H-timidină |
| ARN | 260 (RN-ază) | coloranți bazici | extracție RN-ază | — | $^{3}$H-uridină |
| Histone | — | fast-green pH 8,2 metafosfat, galocianin--cromalaun | extracție cu 0,2N HCl, tripsină | — | $^{14}$C-arginină |
| Proteine nehistonice, globuline, lipoproteine | 280 | Millon, naftol--galben S, fast-green pH 8,2 | extracție cu 0,14 M NaCl +0,2N NaOH | — | $^{14}$C-aminoacizi |
| Carbohidrați | — | PAS | extracție-diastază | — | — |
| Enzime | DPN, TPN | — | fosfatază alcalină | — | — |

care variază cu numărul de molecule absorbante, cînd acesta crește, fie prin mărimea grosimii (d) [1], fie prin sporirea concentrației (c), transmisia scade logaritmic. La trecerea printr-un filtru de la 0,1, transmisia este redusă de la 1,0 la 0,1; dacă lumina traversează două asemenea filtre, T va fi 0,01 etc. Rezultă că transmisia este o funcție reciproc logaritmică a numărului de molecule absorbante situate în calea razei de lumină. Extincția (E) sau densitatea optică (sau absorbția) se exprimă prin formula:

$$E = \log_{10} \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I_1}.$$

Reiese deci că extincția prezintă o relație liniară cu concentrația $E = Kc$ (legea lui Beer) și cu grosimea secțiunii $E = Kcd$ (legea lui Lambert). În aceste ecuații $K = e$, unde e reprezintă coeficientul de extincție, adică extincția unei anumite lungimi de undă a luminii printr-o soluție molară (sau 1%) a substanței absorbante.

În cele mai multe studii histofotometrice se folosesc concentrații sau cantități relative, încît constanta K poate fi ignorată, iar E calculată ca $E = cd$. Dacă este necesar, constanta K pentru o anumită substanță poate fi calculată cunoscînd valorile absolute, furnizate de analizele

[1] d simbolizează termenul german Dicke (grosime).

Scanned with OKEN Scanner

biochimice ale celulelor şi fracţiunilor celulare. În acest sens, există numeroase date privind cantitatea de acizi nucleici, cantitatea medie fiind aproximativ $6{,}0 \times 10^{-12}$g per nucleu. Divizînd această cantitate prin volumul nuclear se obţine concentraţia ADN pe micron cubic.

Valoarea lui K pentru ADN-Feulgen la lungimea de undă 546 mμ este 0,200. Dat fiind faptul că în practică valoarea lui K nu este reproductibilă de la o secţiune la alta din acelaşi ţesut, nu se poate folosi pentru transformarea datelor microspectrofotometrice în valori absolute. Dealtfel, majoritatea problemelor citochimice privind ADN sînt elucidate utilizînd valori relative sau arbitrare.

Legile absorbţiei, aşa cum au fost expuse, sînt aplicabile numai acolo unde moleculele absorbante sînt dispuse la întîmplare, ca în soluţiile perfecte. În celule, acizii nucleici sau cromoforele ataşate au o distribuţie suficient de inegală pentru a nu influenţa rezultatele măsurătorilor. Trasînd curbele de absorbţie pentru un nucleu omogen şi pentru o profază tardivă cu acelaşi volum şi acelaşi conţinut de substanţă colorantă, însă cu zone intens colorate care alternează cu spaţii clare, se constată diferenţe notabile : vîrful curbei de absorbţie corespunzînd profazei tardive este turtit, iar dreapta de extincţie are de asemenea o pantă diminuată. Rezultă că utilizînd două sau mai multe lungimi de undă se pot calcula raporturile dintre extincţii şi totodată eroarea de distribuţie. Aşadar, folosirea tehnicii de măsurare cu două lungimi de undă dă posibilitatea evitării erorilor atunci cînd materialul colorat este neregulat distribuit. După fixare în acid acetic-alcool, cromatina nucleilor hepatici apare în mase neregulate ; dimpotrivă, dacă ficatul este omogenizat în sucroză înainte de fixare, nucleii apar omogeni. Construind curbele de absorbţie pentru cele două tipuri de nuclei se constată trasee aproape identice. Se poate deci conchide că distribuţia neregulată nu produce erori în cazul măsurătorilor cu două lungimi de undă.

Procedeul de măsurare cu două lungimi de undă este relativ simplu. Dat fiind faptul că estimarea substanţei absorbante depinde de diferenţa dintre două extincţii joase (sau transmisii înalte) sînt necesare cîteva condiţii : 1) zona iluminată trebuie să fie omogenă ; 2) lumina pe cît de monocromatic posibilă ; 3) să se evite difuzarea luminii. În practică se selecţionează o suprafaţă omogenă şi se aleg două lungimi de undă $\lambda_1$ şi $\lambda_2$ încît extincţia la o lungime de undă ($E_1$) să fie jumătate din extincţia la cealaltă lungime de undă ($E_2$). Deci $2E_1 = E_2$, unde $E_1 = \log I_0/I_1$ la $\lambda_1$, iar $E_2 = \log I_0/I_1$ la $\lambda_2$.

Cantitatea totală de material absorbant (M) în aria măsurată (A) indiferent de distribuţie este dată de formula : $M = KAL_1D$. În această relaţie K este o constantă ($K = 1/e_1$), unde e reprezintă coeficientul de extincţie la lungimea de undă 1 ($\lambda_1$).

Din cele două transmisii : $T_1$ la $\lambda_1$ şi $T_2$ la $\lambda_2$, diminuările de lumină (L) respective sînt calculate ca $L_1 = 1 - T_1$ şi $L_2 = 1 - T_2$ ; rezultă raportul $L_2/L_1$ cu ajutorul căruia se poate afla factorul de corecţie

pentru eroarea de distribuţie (D). În tabelul nr. 4 sînt redate valorile lui D corespunzătoare raportului $L_2/L_1$.

*Tabelul nr. 4*

**Valorile lui D corespunzătoare raportului $L_2/L_1$**

| $L_2/L_1$ | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,0 | | 4,033 | 3,461 | 3,134 | 2,907 | 2,734 | 2,595 | 2,479 | 2,380 | 2,294 | 1,0 |
| 1,1 | 2,218 | 2,150 | 2,089 | 2,033 | 1,982 | 1,935 | 1,892 | 1,851 | 1,813 | 1,777 | 1,1 |
| 1,2 | 1,744 | 1,712 | 1,683 | 1,655 | 1,628 | 1,602 | 1,578 | 1,555 | 1,533 | 1,511 | 1,2 |
| 1,3 | 1,491 | 1,471 | 1,453 | 1,435 | 1,418 | 1,400 | 1,384 | 1,368 | 1,353 | 1,339 | 1,3 |
| 1,4 | 1,324 | 1,310 | 1,297 | 1,284 | 1,271 | 1,259 | 1,247 | 1,235 | 1,224 | 1,213 | 1,4 |
| 1,5 | 1,202 | 1,191 | 1,181 | 1,171 | 1,162 | 1,152 | 1,143 | 1,133 | 1,124 | 1,116 | 1,5 |
| 1,6 | 1,107 | 1,098 | 1,091 | 1,083 | 1,075 | 1,067 | 1,059 | 1,053 | 1,045 | 1,038 | 1,6 |
| 1,7 | 1,031 | 1,024 | 1,017 | 1,011 | 1,004 | 0,998 | 0,991 | 0,985 | 0,979 | 0,973 | 1,7 |
| 1,8 | 0,968 | 0,962 | 0,956 | 0,950 | 0,945 | 0,940 | 0,934 | 0,928 | 0,923 | 0,918 | 1,8 |
| 1,9 | 0,914 | 0,909 | 0,903 | 0,899 | 0,894 | 0,890 | 0,884 | 0,880 | 0,876 | 0,871 | 1,9 |
| 2,0 | 0,867 | | | | | | | | | | |

Valoarea lui M (calculată ca $AL_1D$ sau $AL_2D$) este echivalentul numărului total de molecule absorbante.

## *Erori în citofotometrie*

Rezultatele citofotometrice pot fi grevate de un număr relativ mare de variabile care le pot influenţa calitatea. Este deci important nu numai de a reduce la minimum aceste oscilaţii, dar şi de a evalua mărimea lor.

Grupînd erorile care pot apărea în cursul operaţiilor fotometrice, rezultă trei categorii de posibilităţi: erori produse de obiectul biologic, erori generate de aparatură şi erori aparţinînd cercetătorului.

### Erori produse de obiectul biologic

*Dispersia luminii.* În cazul cînd indexul de refracţie al obiectului este diferit de cel al mediului de montare, lumina este reflectată şi refractată în afara traseului măsurat. Extincţia rezultată este prea mare din cauza pierderii nespecifice de lumină, neasociată cu absorbţia adevărată. Eroarea creşte la extincţii scăzute. Indicele de refracţie poate fi bine corectat prin observarea obiectului în cîmp întunecat sau în cîmp luminos, cu o apertură numerică joasă şi urmărind linia Becke, adică o bandă de difracţie lată, care se deplasează din regiunile cu indice de refracţie scăzut spre cele cu indice înalt, cînd este ridicat tubul microscopic. În cazul unei reglări bune a indicilor de refracţie nu trebuie să apară linia Becke. În unele cazuri este necesar să se folosească medii de montare cu indici diferiţi pentru nucleu şi citoplasmă.

Scanned with OKEN Scanner

În materialul fixat și colorat, dispersia luminii nu constituie de fapt o problemă; materialul viu sau nefixat poate fi însă afectat de corectarea indicilor de refracție. Se folosesc de preferință ca medii de montare substanțe netoxice, ca sucroza, glicerina, uleiul de parafină.

O pierdere nespecifică de lumină poate apărea și prin impurități pe lamă sau în mediul de montare. Este necesar ca datele privind fondul să fie culese din regiuni foarte apropiate obiectelor de măsurat. Cantitatea pierderii de lumină nespecifică poate fi estimată prin analiza curbelor de absorbție, obținute din regiunile întunecate și luminoase ale aceluiași preparat.

*Eroarea de distribuție.* Există două tipuri de erori de distribuție: *a)* datorate dispersiei neîntîmplătoare a colorantului și *b)* asociate cu variații în traseul razelor prin obiect.

În orice obiect biologic în care distribuția colorantului nu este întîmplătoare, eroarea de distribuție poate să fie o sursă importantă de greșeli. În materialul fixat și colorat mărimea erorii se poate aprecia aplicînd metoda cu două lungimi de undă. Este totuși surprinzător că eroarea prin distribuție neîntîmplătoare este destul de mică, chiar cînd materialul apare neomogen.

Legile absorbției au valabilitate numai în soluții perfecte, menținute în vase cu suprafețe plane, paralele, măsurate cu o lumină cu raze paralele. Cînd se măsoară o sferă conținînd o soluție, intensitatea razelor de lumină care ating fototubul variază de la opac în centrul sferei la luminos la periferia lui. Fototubul sumează această varietate de intensități, realizînd o transmisie medie pentru sferă, din care se calculează extincția medie (Em). Această extincție diferă însă de adevărata extincție medie (E) care s-ar obține dacă s-ar măsura separat extincțiile pentru mici porțiuni de sferă. Discrepanța dintre Em și E devine neglijabilă, atunci cînd se determină numai fragmente de sferă cu diametrul de 2/3 r în loc de a măsura întreaga sferă.

Eroarea de distribuție are loc și în obiecte biologice cu suprafețe plan paralele, dacă fluxul luminos nu constă din raze paralele. Traseul luminos prin secțiunea cu margini paralele este în acest caz mai mare decît grosimea secțiunii, iar lumina măsurată este compusă din raze care au străbătut obiectul sub unghiuri diferite. La o apertură numerică de 0,3 sau mai mică, eroarea de distribuție este însă neglijabilă.

*Determinarea dimensiunilor obiectului.* Pentru numeroase determinări este necesar să se precizeze: grosimea secțiunii, diametrele și volumele celulei, nucleului și nucleolului.

*a)* Grosimea secțiunii se obține prin focalizarea atentă a suprafețelor superioare și inferioare, utilizînd o scală fin dimensionată. O estimare exactă a grosimii este oferită de interferometrie.

*b)* Dimensiunile celulare se calculează folosind un micrometru ocular dispus în capul fotometrului. Imaginile au contururi neregulate la obiectivul mare încît intervine foarte des un factor subiectiv de apreciere. Acest factor de eroare se multiplică cînd diametrele sînt folosite pentru calcularea volumelor. O eroare de măsurătoare de 0,2 μ atrage o eroare



Scanned with OKEN Scanner

de 5,6% pentru o sferă cu diametrul de 10 μ și de 27% pentru o sferă cu diametrul de 2 μ.

O ameliorare netă a posibilității de dimensionări celulare a fost adusă printr-o construcție specială, imaginată de Schiemer (487), care funcționează după principiul lui Abbe, cuplată microspectrofotometrului UMSP I. Conturul celular, trasat cu un creion cu vîrful luminos, este proiectat pe ecranul unui televizor. Dat fiind că desenul celular sau nuclear se face pe o masă deplasabilă care urmează toate mișcările mesei microscopului se pot aprecia electronic toate măsurătorile întreprinse (fig. 3).

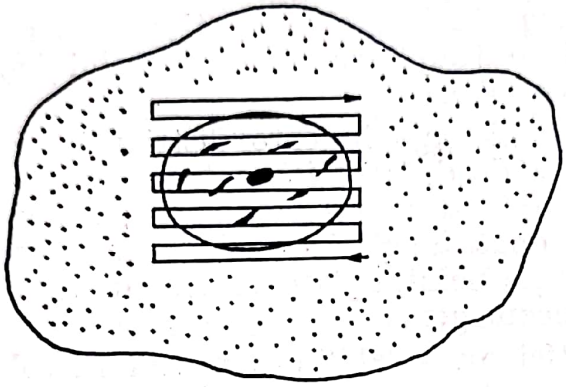


Fig. 3. — Explorarea în formă de meandră a suprafeței nucleare prin programare de areal.

Valorile transmisiei sau extincției sînt înregistrate numai în interiorul teritoriului delimitat prin desen. Teritoriul din jurul zonei trasate cu stiftul luminos reprezintă o transparență de 100% și din această cauză nu se evaluează. În acest fel am putut măsura nu numai celule din frotiuri și amprente, dar și din secțiuni histologice (fig. 4 și 5).

*c)* Variații în forma obiectului. În calcularea cantității de colorant per nucleu sau nucleol se pornește de la presupunerea că obiectul de măsurat este perfect sferic. Dacă în multe țesuturi (ficat, rinichi etc.) se poate considera că nucleii au formă sferică, tumorile se caracterizează printr-o anizocarie marcantă. În aceste cazuri, dispozitivul de calculare a suprafeței („Areal programmierung"-Schiemer (487)), descris la punctul *b*, poate fi foarte util. Erori pot apărea și în cazul nucleilor secționați. Se recomandă utilizarea unor secțiuni suficient de groase spre a evita fragmentări de nuclei, precum și suprapuneri nucleare. Aceste erori pot fi evitate printr-o observație și focalizare judicioase.

O noțiune importantă pentru acuratețea rezultatelor este „valoarea de prag" sau extincția minimă ($E_{min}$) la care se efectuează măsurătorile. Valoarea de prag reprezintă o unitate electronică, permițînd obținerea integralei produsului Δ suprafață × extincție. Se vor măsura numai acele elemente la care extincția $E_1$ este mai mare decît $E_{min}$. Valoarea de prag $E_{min}$ se obține prin măsurarea repetată a extincțiilor aceluiași obiect. Se va utiliza acea valoare de prag care apare sub forma unui platou în diagrama valorii de prag (fig. 6 și 7).

Scanned with OKEN Scanner

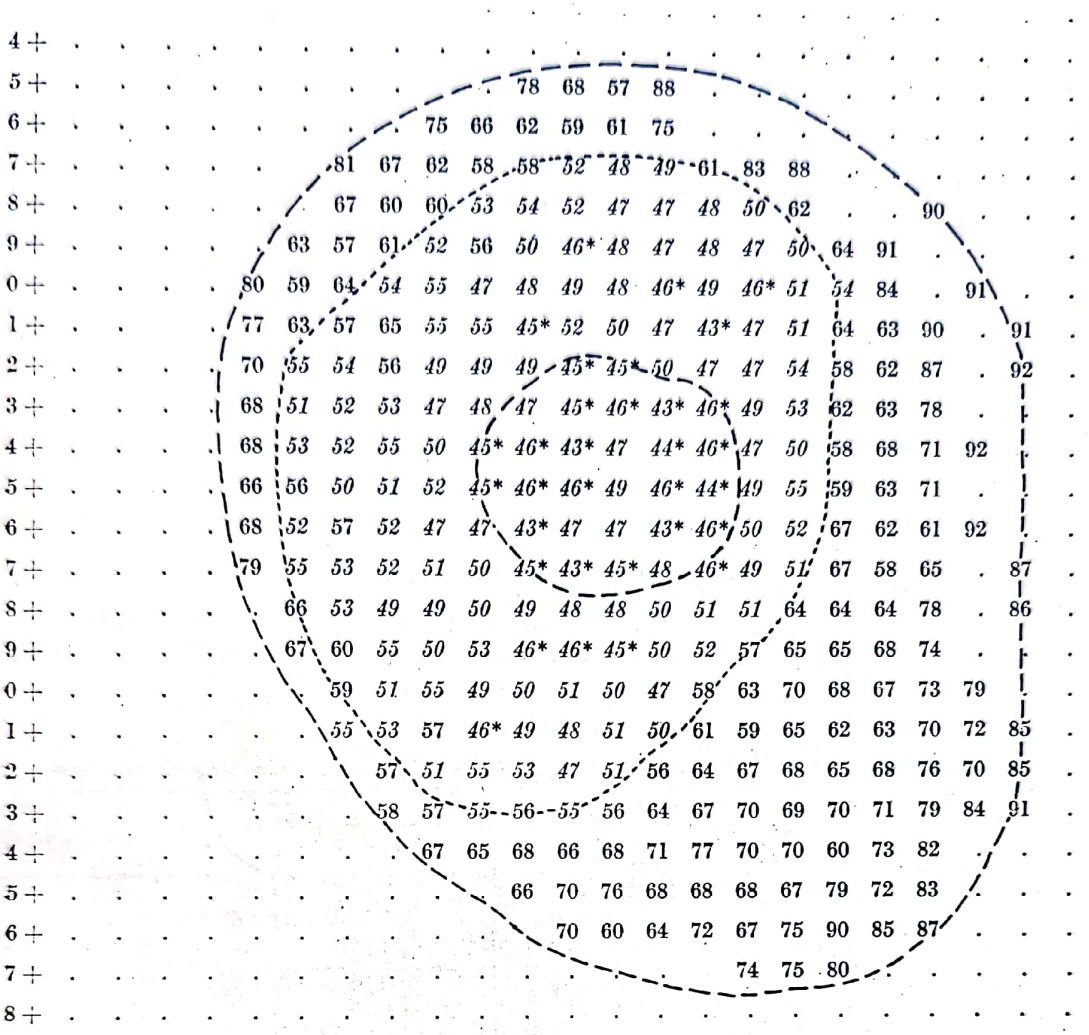


Fig. 4. — Expresia cifrică a unei celule, calculată conform programului elaborat de Schiemer. Cifrele drepte: citoplasma; cifrele cursive: nucleul; cifrele cursive cu *: nucleolul. Liniile punctate reprezintă teritoriile izolate ale citoplasmei, nucleului și nucleolului, așa cum pot fi obținute prin trasarea conturului pe folia de aluminiu a microspectrofotometrului UMSP I (după Schiemer (487)).

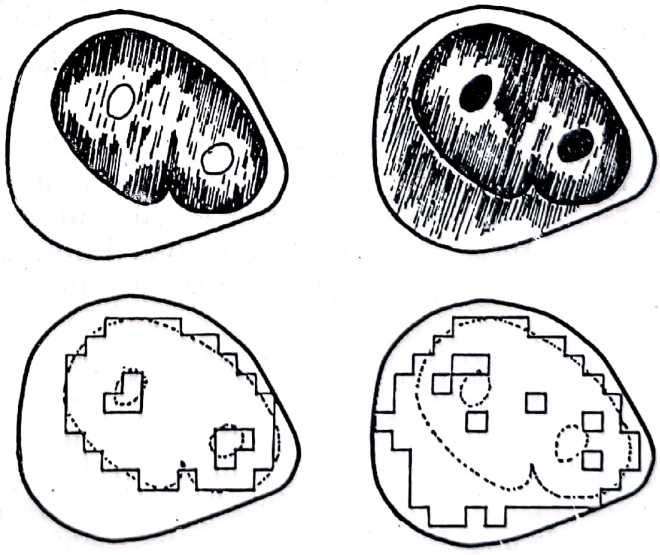


Fig. 5. — Reprezentare schematică a unei celule colorate cu Feulgen (stînga) și galocianin-cromalaun (dreapta) (după Schiemer și Goerttler (490)).

Scanned with OKEN Scanner

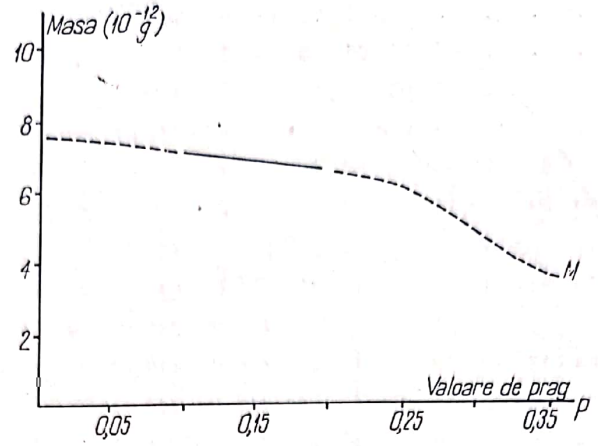



Fig. 6. — Determinarea citofotometrică a conținutului unei substanțe intracelulare ca funcție a valorii de prag. Măsurătorile se efectuează numai în zona platoului.

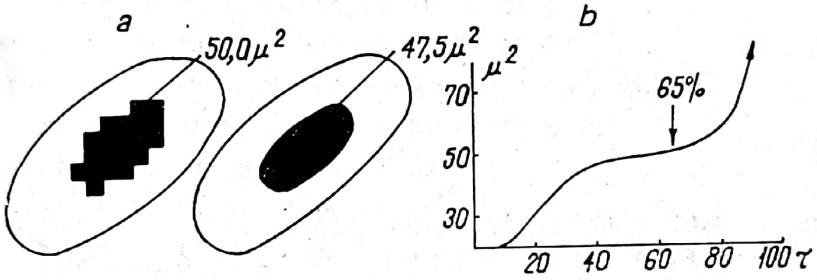



Fig. 7. — *a*, Reprezentarea schematică a unui eritrocit de pasăre, colorat cu Feulgen. La o transmisie de 65 % se înregistrează o suprafață de 50,0 $\mu^2$ în timp ce planimetrarea dă o valoare de 47,5 $\mu^2$. *b*, Curba valorii de prag în funcție de instalarea nivelului de transmisie. Platoul se obține între 40 și 70 % transmisie. În afara acestor valori măsurătorile nu au sens (după Schiemer (487)).

## Erori produse de aparatură

*Paraziții.* În orice fotometru există fluctuații datorate oscilațiilor sursei de lumină, sensibilității fototubului și amplificatorului. Variațiile sursei de lumină pot fi evitate utilizînd transformatori cu voltaj constant. Cînd se folosește metoda cu două lungimi de undă sau cînd se măsoară arii foarte mici, se impune utilizarea unor amplificatori sensibili cu semnal înalt.

Efectul paraziților poate fi considerabil redus prin folosirea valorii medii de la mai multe măsurători efectuate pe același obiect.

*Centrarea instrumentului.* O ușoară deplasare în axa monocromatorului atrage o deviație a lungimii de undă de cîțiva milimicroni. Atunci cînd traseul luminos prin obiect este asimetric, absorbția se modifică și crește brusc dispersia luminii prin lentilă.

*Dispersia monocromatorului.* Benzi de lumină prea late atrag neregularităţi mari la extincţii înalte. Efectul luminii impure deprimă vîrful şi nivelează depresiunile curbelor de absorbţie. În plus, intensităţile variate ale luminii pot fi diferit absorbite în obiect.

Dispersia luminii în monocromator poate fi o sursă importantă de erori, cu atît mai serioase, cu cît apertura numerică a condensatorului este mai mare. De aici recomandarea unei aperturi de 0,3, deşi pentru obiecte sub 2 μ, cum sînt cromozomii, se foloseşte apertura de 0,9. Condiţia optimă este asocierea unei aperturi mari în obiectiv cu o apertură mică la condensator.

## Erori produse de cercetător

Deşi microfotometrul furnizează date obiective, acurateţea operaţiilor depinde în mare măsură de experienţa observatorului. În tabelul nr. 5 sînt prezentate măsurători efectuate pe 10 nuclei hepatici de către 10 cercetători cu o experienţă mică în citofotometrie. Deviaţiile standard indică variaţii de la 5 la 41%.

*Tabelul nr. 5*

**Măsurători efectuate pe aceiaşi 10 nuclei hepatici de către 10 cercetători diferiţi (după Pollister şi Swift (425))**

| Nucleu | Cercetător | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j |
| 1 | 3,33 | 3,40 | 2,88 | 2,89 | 2,61 | 3,31 | 2,94 | 2,99 | 2,56 | 2,71 |
| 2 | 3,37 | 3,17 | 3,16 | 3,10 | 2,53 | 3,17 | 3,02 | 3,02 | 2,48 | 2,86 |
| 2 | 3,62 | 3,02 | 2,80 | 2,74 | 2,54 | 3,28 | 3,06 | 3,19 | 2,28 | 2,52 |
| 4 | 3,30 | 2,94 | 2,82 | 2,72 | 2,18 | 3,64 | 2,90 | 3,00 | 3,36 | 2,62 |
| 5 | 3,41 | 3,15 | 3,18 | 3,21 | 2,80 | 3,28 | 3,42 | 3,17 | 2,80 | 3,05 |
| 6 | 2,96 | 3,46 | 2,70 | 2,76 | 2,95 | 3,62 | 3,12 | 2,88 | 2,50 | 2,38 |
| 7 | 2,70 | 2,68 | 2,68 | 2,74 | 2,29 | 3,06 | 2,68 | 2,74 | 2,32 | 2,40 |
| 8 | 3,64 | 3,30 | 3,31 | 2,93 | 3,10 | 3,36 | 3,12 | 3,11 | 2,70 | 3,12 |
| 9 | 3,61 | 3,19 | 3,41 | 3,34 | 2,42 | 3,45 | 3,18 | 3,06 | 3,14 | 3,24 |
| 10 | 3,32 | 2,66 | 2,81 | 2,64 | 2,38 | 3,07 | 2,98 | 3,02 | 2,63 | 2,59 |
| Media | 3,33 | 3,10 | 3,00 | 2,91 | 2,58 | 3,32 | 3,04 | 3,02 | 2,68 | 2,75 |
| Deviaţia standard | ±0,29 | ±0,28 | ±0,27 | ±0,24 | ±0,29 | ±0,21 | ±0,21 | ±0,14 | ±1,09 | ±0,28 |
| Eroarea standard | ±0,10 | ±0,09 | ±0,09 | ±0,08 | ±0,10 | ±0,07 | ±0,07 | ±0,05 | ±0,36 | ±0,09 |

| Nucleu | Media | Deviaţia standard | Eroarea standard |
|---|---|---|---|
| 1 | 2,96 | ±0,30 | ±0,10 |
| 2 | 2,99 | ±0,30 | ±0,10 |
| 3 | 2,90 | ±0,42 | ±0,14 |
| 4 | 2,93 | ±0,42 | ±0,14 |
| 5 | 3,15 | ±0,22 | ±0,07 |
| 6 | 2,93 | ±0,39 | ±0,13 |
| 7 | 2,60 | ±0,24 | ±0,08 |
| 8 | 3,17 | ±0,27 | ±0,09 |
| 9 | 3,20 | ±0,32 | ±0,11 |
| 10 | 2,81 | ±0,28 | ±0,09 |

Scanned with OKEN Scanner

În tabelul nr. 6 sînt redate valorile pentru 5 nuclei hepatici, măsuraţi de cîte 11 ori timp de 3 zile, de către un cercetător antrenat. Deviaţiile standard sînt situate sub 3%.

*Tabelul nr. 6*

**Determinări repetate efectuate de acelaşi cercetător pe 5 nuclei hepatici de şoarece colorați cu Feulgen (după Pollister şi Swift (425))**

| Determinări | Nucleul | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2,92 | 3,28 | 3,23 | 3,14 | 3,29 |
| 2 | 3,06 | 3,22 | 3,15 | 3,00 | 3,39 |
| 3 | 3,02 | 3,12 | 3,15 | 3,03 | 3,31 |
| 4 | 2,92 | 3,16 | 3,26 | 3,03 | 3,43 |
| 5 | 2,92 | 3,05 | 3,16 | 3,01 | 3,27 |
| 6 | 2,98 | 3,15 | 3,13 | 3,03 | 3,41 |
| 7 | 2,92 | 3,24 | 3,11 | 2,99 | 3,36 |
| 8 | 2,92 | 3,24 | 3,10 | 3,19 | 3,37 |
| 9 | 2,91 | 3,17 | 3,08 | 3,00 | 3,37 |
| 10 | 2,59 | 3,10 | 3,21 | 2,93 | 3,34 |
| 11 | 2,88 | 3,16 | 3,18 | 3,30 | 3,20 |
| Media | 2,94 | 3,17 | 3,16 | 3,06 | 3,34 |
| Deviaţia standard | ±0,05 | ±0,07 | ±0,06 | ±0,11 | ±0,07 |
| Eroarea standard | ±0,02 | ±0,02 | ±0,02 | ±0,03 | ±0,02 |

Un progres substanţial în calculul volumelor nucleare, al cantităţii de acizi nucleici şi a concentraţiei acestora a fost realizat prin adaptarea la microspectrofotometrul universal Zeiss a dispozitivului imaginat de Schiemer (487), care permite delimitarea şi calcularea volumului nucleilor. Datele obţinute, înregistrate pe bandă, sînt apoi înmagazinate în calculatorul electronic. Un exemplu este furnizat de tabelul nr. 7, în care sînt cuprinse datele personale privind volumul nuclear, cantitatea de acizi nucleici şi concentraţia lor la un papilom traheal obţinut cu dietilnitrozamină la hamster (209), (530), (531). Am utilizat în acest scop calculatorul IBM 4 000.

## *Aparatura citofotometrică*

Cel mai simplu citofotometru constă din: 1) un microscop cu tub lateral; 2) un fotometru; 3) un dispozitiv de montare a fotometrului pe o placă rotatorie; 4) o lampă cu un sistem de filtre pentru izolarea unei regiuni spectrale înguste. Cu acest ansamblu se pot măsura concentraţii de substanţe în ariile cu celule omogene sau cantităţi relative în nucleii sferici omogeni. Prin metoda cu două lungimi de undă (189), (190), (191) se pot determina şi obiecte biologice heterogene sau nuclei turtiţi.

Monocromatorul face posibilă construirea curbelor de absorbţie şi extinderea măsurătorilor cu ajutorul metodei cu două lungimi de undă la obiecte neregulate şi la populaţii celulare heterogene.

Scanned with OKEN Scanner

*Tabelul nr. 7*

**Analiza celuară citofotometrică**

0,000000030* .0000006504* 0.0000001*
.0000006504* .00000001* .7522546*
.7522546* 100* .75*

1584 papilom galocianin-cromalaun
0001* 1** 0260* 126* 001* 127* 0126* 1*

Valori medii

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 195.01 | 9.30 | 5.49 | 94.51 | 188.04 | 197.34 |
| 1.41 | .00 | .01 | 99.99 | 1.41 | 1.41 |
| 132.77 | 47675.36 | 376.84 | | | |

Media geometrică

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 176.77 | 9.01 | 5.10 | 94.49 | 169.47 | 179.20 |
| 1.39 | .00 | .01 | 99.99 | 1.39 | 1.39 |
| 126.93 | 46182.07 | 363.83 | | | |

Abaterea standard a valorilor medii

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 82.43 | 2.24 | 2.17 | 2.17 | 81.56 | 82.73 |
| .21 | .00 | .00 | .04 | .21 | .21 |
| 38.26 | 11494.48 | 98.36 | | | |

Abaterea standard a mediei geometrice

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 116.52 | 3.22 | 2.97 | 3.07 | 115.28 | 116.94 |
| .30 | .00 | .00 | .07 | .30 | .30 |
| 54.58 | 16500.88 | 138.96 | | | |

Distribuția

| | HW—VOL | K | CY | HW—MNS | K | CY | HW—MNS | K | CY |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.318 | .0 | 100.0 | .112 | .0 | 100.0 | .00 | .0 | 100.0 |
| 2 | 3.476 | .0 | .0 | .150 | .0 | .0 | .50 | .0 | .0 |
| 3 | 5.212 | .0 | .0 | .200 | .0 | .0 | 1.00 | .0 | .0 |
| 4 | 7.817 | .0 | .0 | .267 | .0 | .0 | 1.50 | .0 | .0 |
| 5 | 11.723 | .0 | .0 | .356 | .0 | .0 | 2.00 | 1.5 | .0 |
| 6 | 17.580 | .0 | .0 | .474 | .0 | .0 | 2.50 | 4.6 | .0 |
| 7 | 26.365 | .0 | .0 | .633 | .0 | .0 | 3.00 | 4.6 | .0 |
| 8 | 39.539 | 1,5 | .0 | .844 | .0 | .0 | 3.50 | 7.6 | .0 |
| 9 | 59.297 | 3.0 | .0 | 1.125 | .0 | .0 | 4.00 | 12.3 | .0 |
| 10 | 88.926 | 7.6 | .0 | 1.500 | .0 | .0 | 4.50 | 15.3 | .0 |
| 11 | 133.361 | 26.1 | .0 | 2.000 | .0 | .0 | 5.00 | 9.2 | .0 |
| 12 | 200.000 | 33.8 | .0 | 2.667 | .0 | .0 | 5.50 | 7.6 | .0 |
| 13 | 299.937 | 24.6 | .0 | 3.557 | .0 | .0 | 6.00 | 10.7 | .0 |
| 14 | 449.881 | 3.0 | .0 | 4.743 | 6.1 | .0 | 6.50 | 4.6 | .0 |
| 15 | 674.575 | .0 | .0 | 6.325 | 13.8 | .0 | 7.00 | 1.5 | .0 |
| 16 | 1011.649 | .0 | .0 | 8.435 | 35.3 | .0 | 7.50 | 4.6 | .0 |
| 17 | 1517.156 | .0 | .0 | 11.248 | 40.0 | .0 | 8.00 | 1.5 | .0 |
| 18 | 2275.254 | .0 | .0 | 15.000 | 4.6 | .0 | 8.50 | 1.5 | .0 |
| 19 | 3412.165 | .0 | .0 | 20.003 | .0 | .0 | 9.00 | 4.6 | .0 |
| 20 | 5117.169 | .0 | .0 | 26.674 | .0 | .0 | 9.50 | 1.5 | .0 |
| 21 | 7674.144 | .0 | .0 | 35.571 | .0 | .0 | 10.00 | 1.5 | .0 |
| 22 | 11508.801 | .0 | .0 | 47.434 | .0 | .0 | 10.50 | 3.0 | .0 |
| 23 | 17259.580 | .0 | .0 | 63.254 | .0 | .0 | 11.00 | .0 | .0 |
| 24 | 25883.937 | .0 | .0 | 84.351 | .0 | .0 | 11.50 | 1.5 | .0 |
| 25 | 38817.762 | .0 | .0 | 112.484 | .0 | .0 | 12.00 | .0 | .0 |
| 26 | 58214.430 | .0 | .0 | 150.000 | .0 | .0 | 12.50 | .0 | 0 |
| 27 | 87303.242 | .0 | .0 | 200.028 | .0 | .0 | 13.00 | .0 | .0 |
| 28 | 130927.400 | .0 | .0 | 266.742 | .0 | .0 | 13.50 | .0 | .0 |
| 29 | 196349.910 | .0 | .0 | 355.706 | .0 | .0 | 14.00 | .0 | .0 |
| 30 | 294463.060 | .0 | .0 | 474.342 | .0 | .0 | 14.50 | .0 | .0 |

Scanned with OKEN Scanner

## Sursele de lumină

În fotometria în lumină vizibilă sursa de lumină trebuie să fie de intensitate foarte ridicată, datorită extremei sensibilităţi a fotomultiplicatorului. Sursele cu spectre de emisie continuă, precum cele furnizate de tungsten sau zirconiu sînt cele mai potrivite pentru adaptarea la monocromator. Lămpile cu mercur sînt utile cînd nu dispunem de un monocromator, dat fiind că linia verde din spectrul lămpii de mercur poate fi izolată prin filtre corespunzătoare. Se preferă în general lampa de tungsten de 100 W. Sursa de lumină trebuie să conţină o lentilă care să focalizeze imaginea pe fanta de intrare a monocromatorului şi un diafragm, astfel încît monocromatorul să nu fie iluminat de un con de lumină prea larg. Pentru a beneficia de o lumină cu intensitate şi puritate maxime este necesar ca distanţa dintre sursa de lumină şi monocromator să fie condiţionată de apertura numerică a monocromatorului.

## Monocromatorul

Este necesar să se folosească un aparat cu bune calităţi optice şi o dispersie moderată. Numeroşi coloranţi au maxime de absorbţie largi care pot fi corect măsurate în benzi luminoase relativ late, deci cu ajutorul unui monocromator cu dispersie relativ joasă.

Există numeroase căi prin care lumina din monocromator poate fi direcţionată în microscop. În unele aparate microscopul fiind plasat la mică distanţă de monocromator, lumina din fanta de ieşire este condusă direct în microscop. Condensatorul este apoi reglat, astfel întîi imaginea fantei să cadă pe planul obiectului de la microscop. Este mult mai convenabil să se plaseze o lentilă la fanta de ieşire care focalizează imaginea fantei în planul focal posterior al condensatorului. Se reduc totodată variaţiile distribuţiei lungimilor de undă în imagine.

În anumite condiţii, monocromatorul poate fi înlocuit cu filtre. Liniile individuale ale lămpii de mercur pot fi izolate cu ajutorul filtrelor, rezultînd o lumină de puritate adecvată, dar numai pentru anumite lungimi de undă. Se pot de asemenea utiliza filtre de interferenţă care au transmisii spectrale mai înguste decît majoritatea filtrelor de gelatină. Filtrele de interferenţă prezintă dezavantajul că introduc lumină impură,eroare care se măreşte la densităţi optice mari. Lumina monocromatică pentru determinări trebuie să lumineze numai o porţiune centrală, mică, din cîmpul microscopic. Cîmpul trebuie să fie însă amplu luminat cînd se alege aria care urmează să fie măsurată.

## Microscopul

Orice microscop standard poate fi utilizat dacă îndeplineşte cîteva condiţii. Esenţială este o bună instalaţie mecanică care să permită deplasări fine pentru centrarea justă a obiectului. Este necesar de asemenea un condensator centrabil.

Scanned with OKEN Scanner

Dat fiind că acurateţea operaţiilor de microfotometrie depinde de o examinare şi o centrare atente ale preparatului înainte de măsurare, este necesar un tub lateral care permite o vedere clară a preparatului. Majoritatea microscoapelor moderne sînt prevăzute cu o prismă situată deasupra obiectivelor care direcţionează raza de lumină în tubul lateral, permiţînd proiecţia directă spre fototub.

Lentilele standard sînt în general satisfăcătoare. Obiectivele apocromatice sînt de preferat cînd se construiesc curbele de absorbţie. Pot fi utilizate atît ocularele Huygens, cît şi Ramsden. Ocularele total sau parţial compensate se folosesc cu obiective apocromatice. Un diafragm cu apertură de 1—3 mm diametru plasat în ocular elimină lumina parazitară, mai ales cînd preparatul produce o mare dispersie sau cînd este necesar un cîmp larg de iluminare. Este esenţial să se folosească condensatori cu apertură numerică mică (0,2—0,4). Cînd se măsoară zone foarte mici, apare necesar un condensator cu apertură mai mare ca 0,4 pentru a creşte puterea de rezoluţie. Folosirea unor condensatori cu apertură numerică mare prezintă însă dezavantaje : traseul luminos prin stratul absorbant este mărit, rezultă pierderi de lumină prin dispersie, iar luminozitatea lentilei poate deveni importantă.

## Capul fotometric

Această piesă trebuie să îndeplinească următoarele condiţii : 1) determinarea mărimii regiunii de măsurat ; 2) limitarea mărimii ariei de măsurat printr-un diafragm ; 3) focalizarea ariei de măsurat pe o mică zonă printr-un fototub optic etanş. Catodul fototubului trebuie bine fixat şi centrat faţă de diafragm. Sistemul de examinare constă dintr-un tub orizontal conţinînd un telescop sau măritor. O simplă lentilă măritoare, în diametru de 20 mm şi distanţă focală de 40—60 mm este cu totul convenabilă. Se recomandă să se plaseze un diafragm în ocular.

Mărimea obiectivului se determină cu ocularul micrometric.

Aparatura pentru morfologia cantitativă este complexă şi costisitoare, dar eforturile constructorilor sînt îndreptate tocmai spre obţinerea de instrumente cu posibilităţi de analiză multiple, economisind astfel timp şi bani.

În prezent există trei grupe de instrumente destinate determinărilor cantitative : 1) aparate universale, aplicabile la numeroase obiecte biologice, însă cu operativitate lentă (aşa-zisele instrumente cu scopuri multiple) ; 2) aparate foarte rapide pentru studii metabolice de tip integrativ cu „scanning" rapid ; 3) instrumente mai puţin rapide decît cele din grupul al doilea, dar permiţînd o analiză largă a metabolismului celular şi utilizînd preselecţia cîmpului de măsurat.

## Aparate cu scopuri multiple

Un aparat de acest tip este microspectrofotometrul universal UMSP I care permite o rezoluţie aproape de limita fizică în lumina vizibilă şi ultravioletă. Aparatul a fost conceput pentru măsurătorile de spot, precum

Scanned with OKEN Scanner

și pentru măsurători integrative (fig. 8). În cazul acestora din urmă, microspectrofotometrul înregistrează absorbția obiectului determinată prin măsurarea unor spoturi foarte mici de-a lungul liniilor de „scanning". Un progres însemnat a fost realizat prin construirea de obiective de tip ultrafluar cu lentilă acromatică. Din cauza caracteristicilor tehnice, permițînd o rezoluție înaltă, precum și măsurători de spot și integrative aparatul funcționează lent.

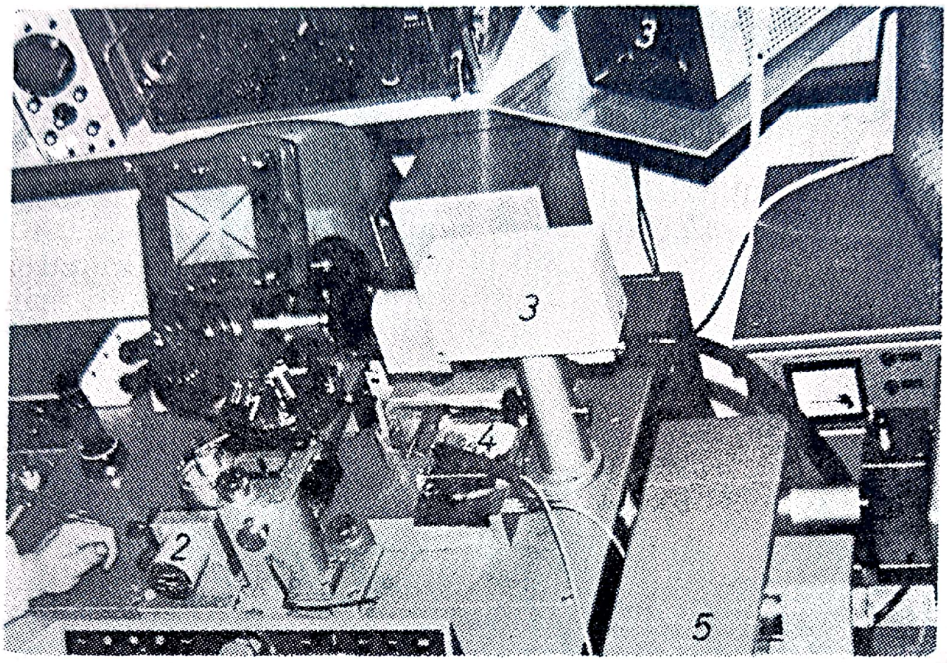



Fig. 8. — Instalația de măsurare a suprafețelor (detaliu). *1*, masă Caspersson; *2*, motor cu mișcare sacadată; *3*, televizor; *4*, masa pentru desenarea conturului celular în vederea separării de celelalte celule cu ajutorul stiftului luminos; *5*, monocromator.

## Aparate pentru studiul rapid al populațiilor celulare

Progresele rapide ale chimiei acizilor nucleici și proteinelor au atras construirea unor noi aparate care să permită studiul cineticii celulare în legătură cu sinteza proteinelor sau acizilor nucleici. Ideea a fost ca, renunțînd la secțiunile histologice, să se utilizeze suspensii celulare care să fie analizate fotometric. Timpul de lucru se reduce astfel de 100—1 000 de ori față de aparatura utilizînd secțiunile microscopice. Aceasta permite executarea de „screening"-uri, precum și studii rapide privind acțiunea unor agenți antitumorali, identificarea celulelor în curs de cancerizare etc.

## Aparate cu preselecția cîmpului de măsurat

Necesitatea aplicațiilor microscopiei cantitative rapide la componente subcelulare, ca nucleu, nucleol, cromozomi, a dus la construirea unor aparate care să permită preselectarea cîmpurilor microscopice în vederea cantificării elementelor endocelulare. Au apărut astfel ultramicrospectro-

Scanned with OKEN Scanner

fotometre pentru lumină ultravioletă și vizibilă, ultramicrointerferometre, ultramicrospectrofluorimetre. Progresele în acest domeniu au permis dimensionarea cromozomilor de mamifere care, așa cum se știe, sînt cuprinși între una și cîteva lungimi de undă de lumină vizibilă. Lucrînd la limita cea mai scăzută a rezoluției este posibil să se obțină informații privind distribuția ADN de-a lungul cromozomilor. Posibilitatea de a se obține atari detalii privind distribuția ADN în cromozomii în metafază a dus la utilizarea determinărilor ADN pentru studiul diferențierii chimice a metafazelor. Marea sensibilitate a procedeelor ultramicrofluorimetrice permite aprecierea unor cantități de $10^{-16}$ g ADN.

## *Microspectrofotometria în lumină ultravioletă*

Microscopul în lumină ultravioletă (UV) a fost folosit ca un microspectrofotometru de absorbție de către Caspersson (75), (76) și a jucat un rol central în relevarea distribuției acizilor nucleici în sistemele celulare. Cu mult timp înainte, în 1904, Köhler construise microscoape complet echipate pentru studiul regiunii spectrale între 230 și 280 mμ. Studiile fundamentale ale lui Caspersson au demonstrat cu claritate că absorbția puternică de către cromozomi, nuclei și citoplasmă se datorește concentrațiilor mari de acizi nucleici și de proteine (fig. 9 și 10). Aceste cercetări au constituit premisa observațiilor foarte valoroase privind implicațiile acizilor nucleici în creșterea celulară, sinteza proteică, transmisia informației genetice etc.

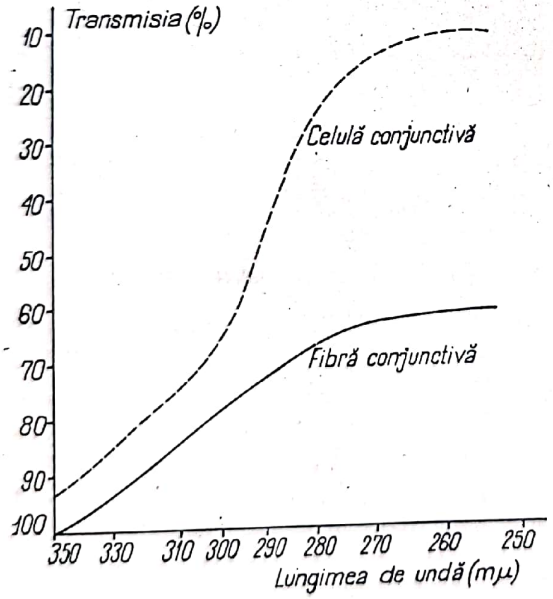



Fig. 9. — Spectrul de transmisie în lumină ultravioletă al unei celule conjunctive și al unei fibre conjunctive în tegumentul uman. Preparat incolor realizat la UMSP I.

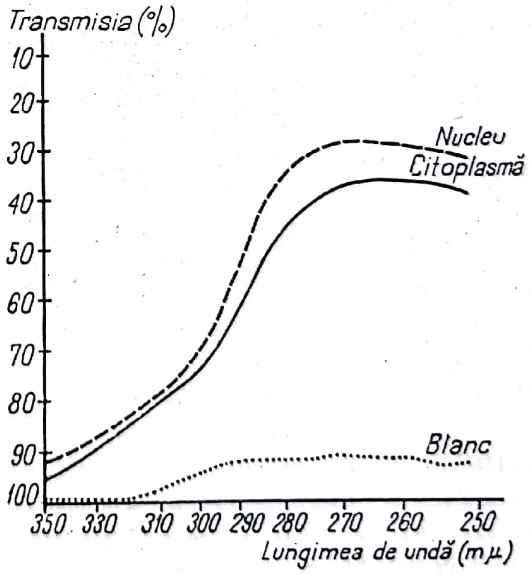



Fig. 10. — Spectrul de transmisie la UMSP I pe preparat incolor al unei celule bazale în epiteliul uman. Citoplasma prezintă un maxim de absorbție la 265 mμ, ceea ce indică prezența acizilor nucleici.

Scanned with OKEN Scanner

După 1960 în aparatura optică au apărut remanieri și ameliorări remarcabile: obiective apocromatice refractante de cuarț-florit, lămpi puternice, monocromatoare și fotomultiplicatoare de calitate excelentă.

Problemele care se pun astăzi microspectrofotometriei în UV sînt legate mai ales de materialul biologic investigat și mult mai puțin de aparatură, care a atins un mare grad de perfecțiune. Rezultate fructuoase ale microspectrofotometriei sînt de așteptat prin asocierea acesteia cu dozări biochimice la nivel celular cu ajutorul micromanipulatorului.

Fotografia în UV se poate executa pe filme sau plăci. Acestea din urmă au avantajul stabilității dimensionale și ușurința manipulării în majoritatea densitometrelor; necesită însă o mai mare cantitate de energie pentru a produce o imagine de densitate adecvată (fig. 11 și 12).

Emulsiile fotografice trebuie alese ținînd seama că granulația pune anumite limite în precizia analizei densitometrice. În general materialul fotografic cu contrast puternic dă cele mai bune rezultate, dar este necesar ca mărimea imaginii să compenseze paraziții introduși de granulație. Acuratețea metodei fotografice depinde mult de densitometrul folosit pentru baleiajul imaginii.

Problema fixării celulelor și țesuturilor pentru examinarea în lumină ultravioletă a fost îndelung cercetată. Necesitățile de fixare depind de produsul care urmează să fie examinat: ADN este bine reținut *in situ* de fixatori acizi, alcool, acetonă sau soluții cu acid acetic. Fixarea ARN este mai dificilă: forma solubilă este probabil extrasă de majoritatea fixatorilor apoși, deși cea mai mare parte de ARN legat de proteine este conservată. O pierdere marcantă în greutate uscată are loc prin fixarea în formol și alcool acetic, deshidratare și includere în parafină. Majoritatea pierderilor este reprezentată de lipide și hidrocarbonate, dar s-a demonstrat și o pierdere în proteine. Foarte recomandabil este procedeul congelare-desicare.

## *Aplicații ale citofotometriei*

Odată cu lucrările lui Caspersson, aplicațiile citofotometriei s-au extins treptat în histochimia cantitativă, cuprinzînd domenii extrem de întinse în studiul acizilor nucleici, proteinelor, hidraților de carbon și enzimelor. Ele vor fi tratate, în cursul lucrării, în diversele capitole care se ocupă de substanțele menționate.

Apărute mai recent, cercetările de citoenzimologie bazate pe măsurători histospectrofotometrice întîmpină încă unele dificultăți legate de eroarea de distribuție și de valorile mari ale indicilor de absorbție și de refracție. Perfecționarea metodelor în acest domeniu a început cu lucrările lui Felgenhauer și Glenner (174) în 1966. La noi în țară, contribuții de valoare în histochimia semicantitativă a activităților enzimatice au fost aduse de Diculescu și Onicescu în studiul epimerazelor (129), (130), (131), Diculescu și colab. în investigarea activității L-aminoacid-tetrazolium-reductazei (128) și de Onicescu și colab. în cercetări privind dihidrofolat-reductaza (399), (400), (401).

Scanned with OKEN Scanner

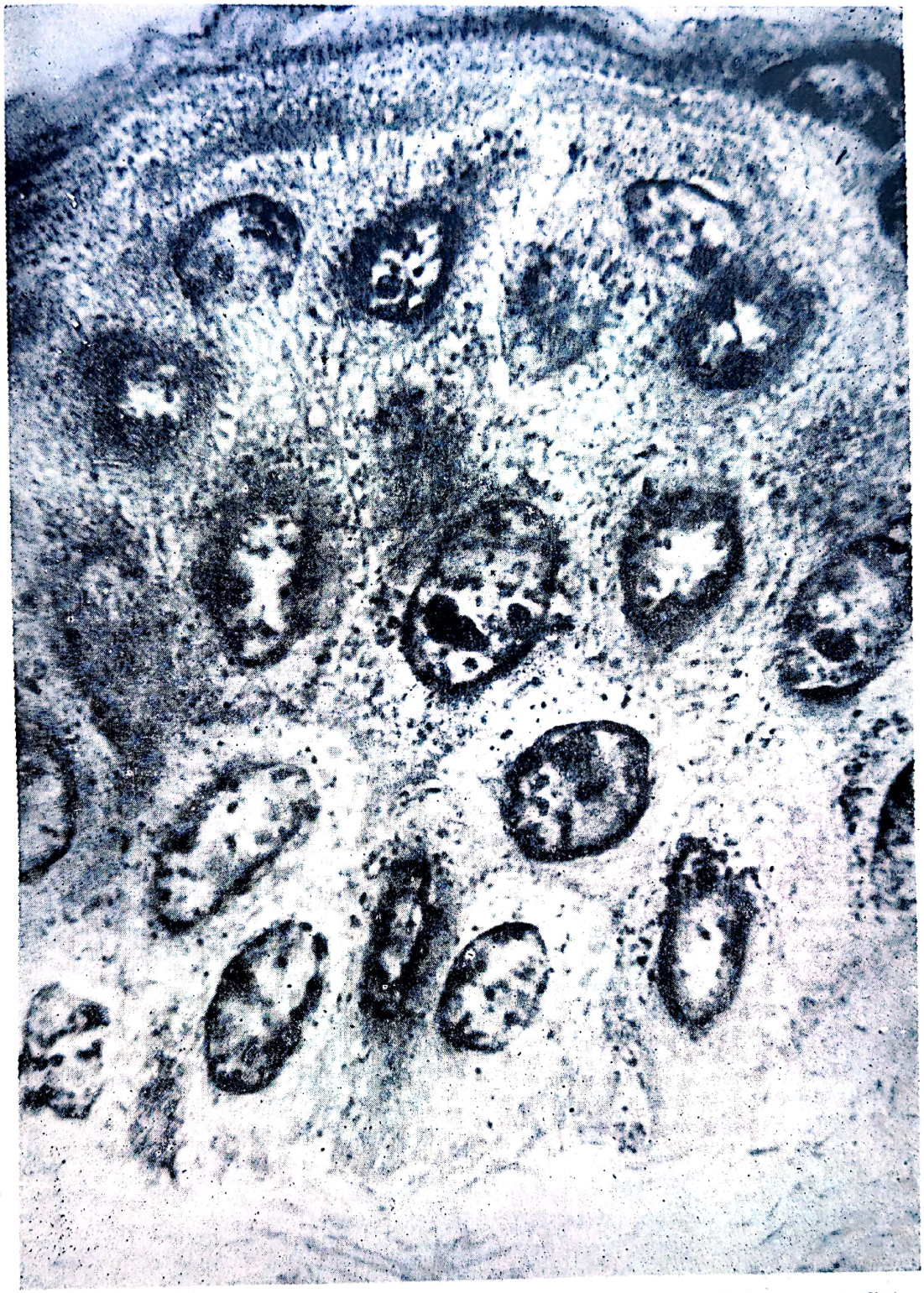


Fig. 11. — Epiderma unui copil de două zile. Preparat necolorat, fotografiat în lumină ultravioletă la 265 mμ spre a se evidenția acizii nucleici (× 1 000).

Scanned with OKEN Scanner

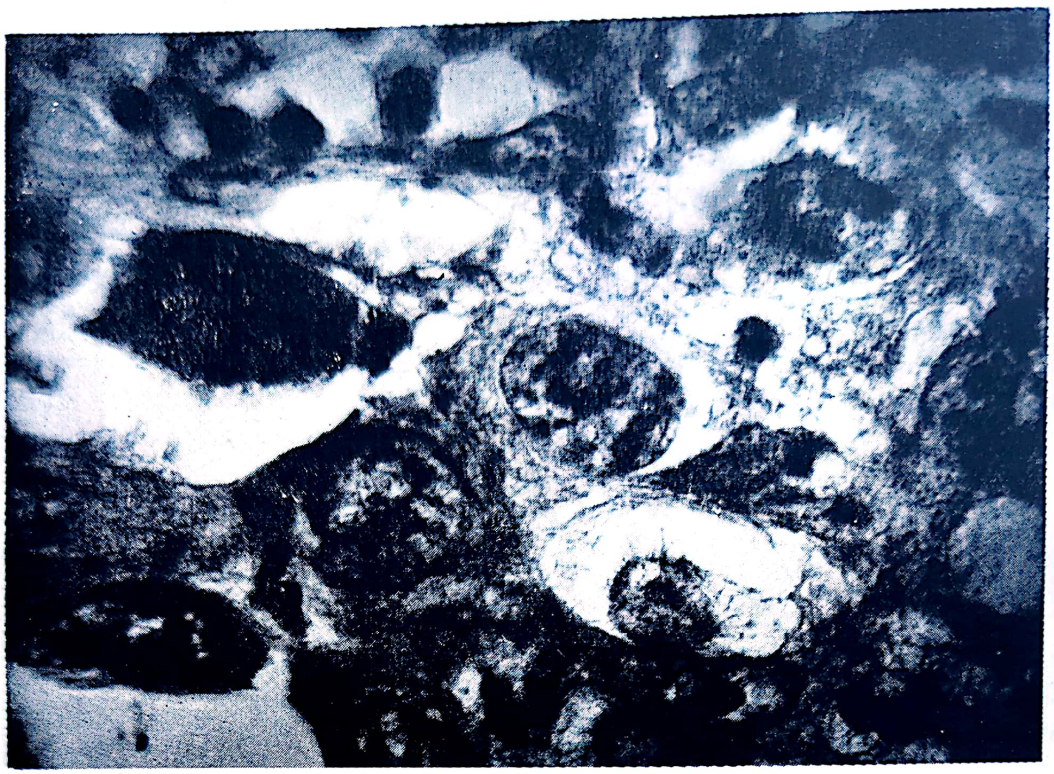


Fig. 12. — Preparat necolorat din epiderma de șobolan tratat cu benzpiren. Secțiune prin zona neoplazică. Fotografie în lumină ultravioletă spre a se evidenția acizii nucleici (× 1 180).

Extincția formazanului măsurată prin microdensitometrie poate fi corelată cu concentrația formazanului în aceeași secțiune, determinată prin eluție și spectrofotometrie (8), (70). Extincția la 520 μm nu crește liniar odată cu mărirea cantității de formazan în secțiunile incubate diferit ca durată. La lungimea de undă de 585 μm extincția este direct proporțională cu cantitatea de formazan din secțiuni. În scopul determinării citofotometrice a cantității de formazan este necesar să se utilizeze secțiuni în care produsul de reacție să fie distribuit pe cît de egal posibil.

Activitatea acetilcolinesterazei și fosfatazei acide determinată citofotometric a fost corelată cu diametrul celulelor din ganglionul spinal (308). Din observațiile lui Kokko (308) rezultă că, deși densitatea medie a acetilcolinesterazei variază între 0,32 și 0,79 unități arbitrare, apar corelații negative înalte, coeficientul de corelație fiind cuprins între —0,46 și —0,69. Corelații bune au fost observate între activitatea acetilcolinesterazei și fosfatazei acide determinate citofotometric. În acest caz coeficientul de corelație oscilează între 0,19 și 0,71. Din cercetările lui Kokko (308) rezultă că celulele mici prezintă activități sporite ale acetilcolinesterazei și fosfatazei acide, în comparație cu celulele mari.

Scanned with OKEN Scanner

# 4. Tehnici de coloraţie pentru evidenţierea acizilor nucleici şi proteinelor

Metodele optice noi calitative şi cantitative au extins considerabil cunoaşterea rolului acizilor nucleici în sinteza proteică, în creştere, diviziunea celulară şi în întreaga fiziologie a celulei. În acest sens, dezvoltarea de către Caspersson a microspectrografiei în ultraviolet a determinat direcţii foarte fertile în histochimie.

Tehnicile histochimice folosite decurg din structura chimică a acizilor nucleici : acidul fosforic, gruparea hidrocarbonată şi bazele purinice şi pirimidinice. Componenta hidrocarbonată a fost utilizată în determinările biochimice, iar Feulgen şi Rossenbeck au evidenţiat-o histochimic.

În continuare ne ocupăm de valoarea calitativă şi cantitativă, condiţiile tehnice şi aplicabilitatea metodelor utilizate pentru evidenţierea acizilor nucleici. Am selecţionat dintre acestea, reacţia Feulgen şi metoda cu galocian-cromalaun.

## Tehnici de coloraţie pentru evidenţierea acizilor nucleici

### Coloraţia HCl-Feulgen-Schiff

Socotită ca una dintre reacţiile histochimice cele mai studiate, metoda Feulgen este specifică ADN-ului, furnizînd date privitoare la cantitatea relativă de acizi nucleici. Leuchtenberger (339) şi Walker şi Richards (552), revăzînd literatura de specialitate, consideră că se pot obţine rezultate precise folosind tehnica Feulgen, dacă măsurătorile se efectuează cu aparatura adecvată. Dovezi pentru specificitatea şi stoichiometria reacţiei Feulgen au fost aduse prin folosirea unor filme de gelatină conţinînd cantităţi cunoscute de ADN, cu ajutorul cărora s-a putut observa coloraţia proporţională a concentraţiilor de ADN şi, implicit, apartenenţa acestei tehnici la legea Lambert-Beer. Din lucrările lui Pollister şi Swift (425) rezultă că nucleii coloraţi cu Feulgen nu sînt supuşi erorilor de dicroism.

Stoichiometria sau proporţionalitatea coloraţiei cu cantitatea de ADN presupune, pe de o parte, că hidroliza acidă afectează celulele în mod egal. Pe de altă parte, intensitatea reacţiei Feulgen este dependentă de timpul de hidroliză (51), (136), (137), (339), (519), (520), (521), (522).

Cercetările lui Swift (522) au atras atenţia asupra rolului concentraţiei de hidrogen în reacţia Schiff. Walker şi Richards (552) arată că intensitatea coloraţiei Feulgen în nucleii ficatului de şoarece se dublează, dacă pH-ul se ridică de la 1,3 la 2,0. Purinele din ARN sînt de aseme-

Scanned with OKEN Scanner

nea capabie de a fi îndepărtate prin hidroliză acidă (549), dar numai dezoxizaharurile se comportă ca adevărate aldehide și dau reacția Feulgen. Diferența de comportament a radicalilor zaharici stă totodată la baza altor metode colorimetrice pentru estimarea ADN (135). Trebuie remarcat faptul că ARN este extras rapid din țesuturile fixate în cursul hidrolizei acide (159), (516), în timp ce pentru extracția ADN este necesară o hidroliză mai prelungită (137), (159), (266), (522). Hidroliza convențională pentru tehnica Feulgen are loc în 1N HCl la 60°C; au fost folosite însă și alte concentrații de HCl, temperaturi mai joase (294), (468), (472), iar în locul HCl, acidul percloric (137), (567) sau acidul tricloracetic (47). Utilizînd acest din urmă acid, Bloch și Godman (47) au elaborat o tehnică pentru colorarea și măsurarea ADN și histonelor în aceeași celulă. Prin această metodă ADN este pus în evidență prin hidroliza cu acid tricloracetic și ulterior histonele sînt colorate după tehnica Alfert și Geschwind (5). În procedeul recomandat de Fand (169) se folosește hidroliza cu 3,5 N HCl timp de 15—20 min, la 37°C. Bielanska și Osuchowska (43) comunică rezultate bune, utilizînd hidroliza în 1N acid tricloracetic timp de 12—20 min, la 60°C. Lucrări numeroase (182), (281) (294), (345), (541) au subliniat avantajele hidrolizei cu 5N HCl la 20°C, timp de 30 min. Acestea constau în obținerea unor valori Feulgen cu 20—30% mai mari decît hidroliza prin căldură și în îndepărtarea totală a proteinelor nucleare bazice care perturbă reacția Feulgen (393).

Baza chimică pentru colorația Feulgen a fost investigată de Wieland și Scheuing (562). După acești autori, prin acidul sulfuros adăugat la pararozanilnă rezultă reactivul Schiff decolorat, un derivat acid aminosulfonic al acidului pararozanilinleucosulfonic. Adăugarea a două grupări aldehidice la derivatul incolor de pararozanilină atrage eliberarea grupului acid sulfonic, iar molecula este transformată în forma chinoidă, colorată în roșu- Studii mai recente arată însă că mecanismul este în realitate mai complex. Atunci cînd leucoreactivul Schiff se combină cu formaldehida apar numeroși produși, colorați atît cromatografic (32), cît și electroforetic (271). S-a sugerat astfel că produșii de reacție ai reactivului Schiff cu aldehidele sînt derivați ai acidului amino-alkil-sulfonic (229), (277), (390). Hardonk și van Duijn (229) consideră că produșii de reacție constatați de Barka și Ornstein (32) pot fi explicați prin substituenții acidului alkil-sulfonic, care înlocuiesc unul sau mai mulți din cei 6 hidrogeni ai aminelor primare din molecula de pararozanilină. Aceiași autori au remarcat că tetrametilpararozanilina, care are o singură amină primară cu doi hidrogeni reactivi, dă patru produși de colorație.

Reactivul Schiff convențional este format din fuxină bazică, un amestec de pararozanilină și congenerii săi mono- și dimetil substituiți (94). Mai recent au fost propuși numeroși alți coloranți ca înlocuitori ai fuxinei bazice (298), (299), (300), (403), (404). Printre aceștia figurează compuși de tipul: oxazină, tiazină, trifenilmetan etc., avînd ca grupare caracteristică o amină primară (298), (299), (403). Un număr din acești coloranți sînt fluorescenți și oferă perspectiva utilizării lor pentru studiul sediilor, în care ADN se află în concentrație scăzută (403). Diferitele formule propuse pentru reactivul Schiff se deosebesc considerabil ca pH, cantitate de colorant și de $SO_2$ (300), (346), care modifică substanțial cantitatea de colorant Feulgen per nucleu. De aici rezultă necesi-

Scanned with OKEN Scanner

tatea utilizării unui sistem standard de colorare, precum și folosirea unui anume tip celular pentru standardizarea și, ulterior, compararea rezultatelor.

În general ADN din țesuturile fixate în lichide conținînd cromat sau bicromat rezistă hidrolizei mai mult timp (30—60 min) decît cel din țesuturile fixate în alcool acetic sau formol (8—10 min). Intensitatea maximă a reacției Feulgen apare după fixare în reactivul Lillie: formol — alcool — acid acetic (136), (522).

Mărimea blocurilor de țesut joacă de asemenea un rol important: pătrunderea fixatorului în fragmentele mari se face inegal; de aici diluția și alterarea conținutului de la periferie spre centrul țesutului. Nucleii periferici au valori Feulgen cu 30% mai mari decît nucleii centrali (6), (522). Fenomenul se datorește probabil pierderii de proteine, dat fiind faptul că practicarea reacției Millon pentru resturi de tirozină arată că nucleii cu cantități mai mari de colorant Feulgen prezintă valori Millon mai reduse (423), (424), (522). Nucleii în secțiunile la congelație, ca și nucleii izolați în sucroză, dau valori Feulgen mai mari decît nucleii similari situați la periferia fragmentelor de țesut. Deoarece izolarea nucleilor duce la o pierdere a proteinei nucleare, în special nehistonice, este posibil ca această proteină să aibă un rol inhibitor în reacția Feulgen. Într-un studiu calitativ al reacției Feulgen, Jordanov (294) notează că temperatura crescută a băii de hidroliză este într-un grad mai mare responsabilă de pierderea stabilității reacției Feulgen decît aciditatea soluției. Extracția țesutului optimal hidrolizat prin apă sau 5N HCl la 60°C atrage o pierdere marcantă a intensității colorației Feulgen, în timp ce pierderea apare mult mai lent la temperatura camerei.

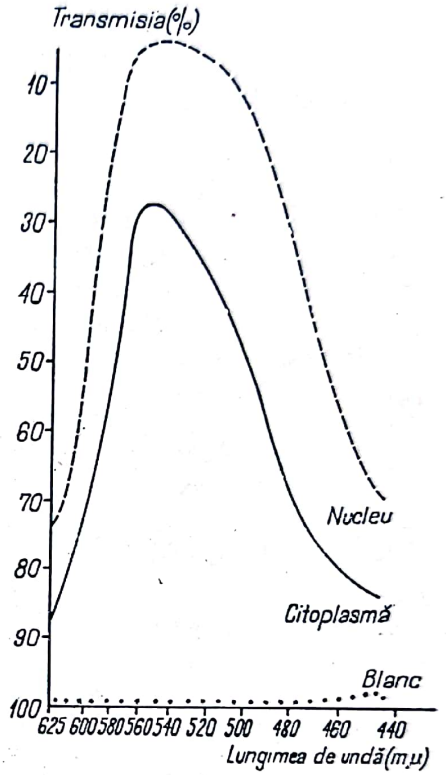



Fig. 13. — Spectrul de transmisie al unei celule bazale din pielea umană colorată cu Feulgen. Citoplasma are, ca și nucleul, un maxim de absorbție la 565 mμ, ceea ce este o indicație pentru prezența ADN în citoplasmă.

Timpul variabil de hidroliză determină de asemenea diferențe în curbele de absorbție la colorația Feulgen (403), (522). Odată cu creșterea duratei de hidroliză, curba de absorbție, care are la început un singur maxim la 560—565 mμ (fig. 13) dezvoltă treptat un nou pic la 530—550 mμ, pînă cînd, după 30 min, acest al doilea maxim este mai mare decît cel de la 565 mμ.

În general, reacția Feulgen prezintă o proporționalitate cu numărul de cromozomi și cu cantitatea de ADN (125), (442), dacă se respectă condițiile optime de fixare, de hidroliză și de măsurătoare. Discrepanțele dintre valorile Feulgen și conținutul în ADN se datoresc tocmai nerespectării acestor condiții (393).



Scanned with OKEN Scanner

## Coloraţia galocianin-cromalaun

Tehnici histologice mai vechi au folosit lacul cromic al galocianinei (35). Galocianina aparţine coloranţilor oxazinici şi se prezintă în soluţii apoase sub formă de cation. Poziţia sarcinii pozitive nu este complet clarificată, dată fiind existenţa mai multor forme de mezomerie. După Harms este de preferat forma parachinoidă, deoarece dă coloraţia cea mai intensivă. Pentru producerea lacului cromic de galocianină, aceasta se fierbe într-o soluţie de cromalaun 5%. Einarson (156), care s-a ocupat îndeaproape cu mecanismul formării lacului, a postulat apariţia unui complex cromic pe grupările carboxil şi hidroxil în poziţia para. După Harms are loc de asemenea formarea unui complex salin cu cîte o valenţă principală şi una secundară a cromului la ambele grupări hidroxil. La fierberea galocianinei cu cromalaunul, ionul crom (III) se leagă la galocianină cu $6H_2O$ sub formă de $Cr(H_2O)_6^{3+}$ şi totodată se schimbă şi proprietăţile optice ale colorantului.

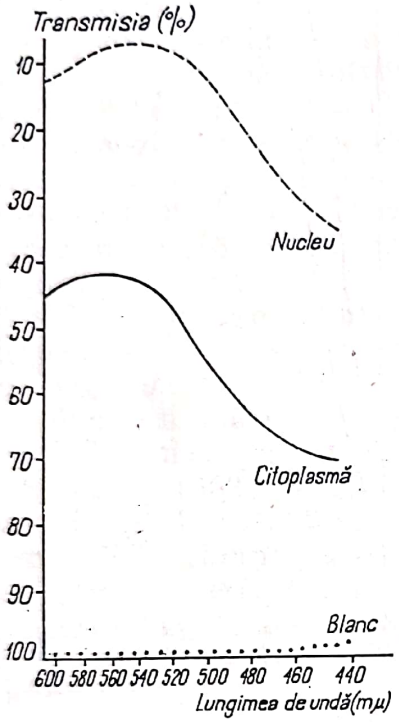



Fig. 14. — Spectrul de transmisie al unei celule bazale din pielea umană. Coloraţie cu galocianin-cromalaun.

Galocianina în concentraţie de 0,15% prezintă un alt maxim de absorbţie (530 mμ) faţă de lac, dar şi coeficientul de extincţie sporeşte de 30 de ori. Lacul colorat prezintă maximul de absorbţie la 575 mμ (fig. 14). Deci, prin introducerea cromului rezultă o deplasare spre roşu. Cromalaunul singur prezintă doar o absorbţie relativ slabă la 400 şi 570 mμ.

Faţă de alţi coloranţi, galocianin-cromalaunul prezintă o mare specificitate, dat fiind că, pe de o parte, la pH 1,64 nu intervin în concurenţă proteinele şi, pe de altă parte, coloraţia este progresivă.

Studii numeroase s-au ocupat de coloraţia cu galocianin-cromalaun, ca metodă pentru cantificarea acizilor nucleici. Experienţe cu un mare număr de tipuri celulare atît de la mamifere, cît şi de la alte vertebrate atestă paralelismul dintre conţinutul în ADN şi cantitatea de colorant legată de nucleu, după tratament cu ribonuclează. Observaţia este concludentă numai pentru celulele somatice, deoarece intensitatea de coloraţie a celulelor spermatice, complet diferenţiate, este mai mică decît cea aşteptată în raport cu conţinutul lor în ADN. Cauzele acestei coloraţii mai puţin intense constau în faptul că, pe de o parte, spermatozoizii conţin o proteină mult mai bazică decît histonele nucleilor somatici şi, pe de altă parte, că nucleoproteinele din capul spermatozoizilor sînt aglomerate dens şi ordonat.

O metodă de eliminare a influenţei competitive a grupărilor aminoproteice asupra colorării acizilor nucleici este de a bloca aceste grupări

prin acetilare. Metoda a fost dealtfel utilizată de Deitch (121) și Rigler (443) în scopul măririi intensității coloraţiei și pentru a spori reproductibilitatea rezultatelor.

Blocarea grupărilor aminoproteice prin acetilare atrage creșterea bazofiliei nucleilor. Cantitatea de albastru de metilen legat de limfocitele din timus este mai mare cu 30% după acetilare (120), (122). Înlocuind albastrul de metilen cu galocianin-cromalaun nu se mai observă creșterea coloraţiei nucleare. Acest rezultat se poate interpreta în sensul că grupările bazice ale proteinelor nu acţionează ca grupări competitive în cazul utilizării galocianin-cromalaunului. Nu este posibil să se mărească legătura galocianin-cromalaunului în capetele spermatozoizilor prin acetilare, probabil datorită unor factori sterici, de dispunere densă a nucleoproteinelor la acest nivel.

Cercetările lui Kiefer (301) bazate pe măsurarea intensității de coloraţie a nucleilor comparativ în lumina ultravioletă și după coloraţie cu galocianin-cromalaun indică o relaţie stoichiometrică între acest colorant și conținutul în acizi nucleici.

## *Determinarea separată a ADN și a ARN*

S-au publicat pînă în prezent trei metode diferite pentru evaluarea separată a ADN și a ARN în aceeași celulă.

1. Măsurarea conţinutului total a acizilor nucleici prin absorbţie în ultraviolet. Ulterior se determină ADN în coloraţia Feulgen. Cunoscînd relaţia dintre intensitatea coloraţiei Feulgen și absorbţia în ultraviolet a ADN este posibil să se calculeze fracţiunea absorbţiei în ultraviolet determinată de ADN.

2. În a doua metodă se estimează conţinutul total în acizi nucleici la coloraţia albastru de metilen, apoi colorantul și ARN sînt îndepărtaţi prin acid hidrocloric. După o a doua coloraţie cu albastru de metilen se poate determina cantitatea de colorant legată de ADN.

3. A treia metodă se bazează pe determinarea fluorometrică a ADN și a ARN după colorarea cu acridin-oranj.

Kiefer și colab. (302), pornind de la constatarea că galocianin-cromalaunul rezistă la eluţia cu apă și alcool și este foarte lent îndepărtat prin tratamentul cu acizi, au combinat reacţia Feulgen cu coloraţia cu galocianin-cromalaun. Se pot determina cantităţile ambilor coloranţi prin măsurarea la două lungimi de undă la care absorbţiile sînt complet diferite. Absorbţia maximală a galocianin-cromalaunului la 570 mμ fiind foarte apropiată de a pararozanilinei s-a înlocuit această ultimă substanţă prin corifosfină O, care are maximul de absorbţie la 450 mμ. Din cercetările amintite rezultă că se menţine proporţionalitatea dintre ARN și galocianin-cromalaun și după hidroliză. Deși nucleii coloraţi cu galocianin-cromalaun leagă mai puţină corifosfină O decît nucleii necoloraţi, proporţionalitatea dintre conţinutul în ADN și corifosfina O se păstrează.

Scanned with OKEN Scanner

### *Condiţii de coloraţie*

Durata de fierbere a fost diferit apreciată; astfel Einarson (156) a recomandat 5 min, în timp ce Stenram (509) a propus 18 ore. Extincţia creşte brusc pînă la o durată de fierbere de 10 min, rămînînd apoi la acelaşi nivel. Deoarece nu apar modificări ale spectrului de absorbţie la o durată de fierbere de 25 min, se poate conchide că nu au loc polimerizări ale colorantului. Intensitatea de coloraţie a soluţiei de galocianin-cromalaun creşte cu durata timpului de fierbere (509). Rezultă o creştere rapidă a conţinutului de colorant per celulă în primele 2 min, după care se atinge un platou. O comparaţie între creşterea extincţiei soluţiei colorante şi cantitatea de colorant în funcţie de durata de fierbere arată că cele două curbe nu ating concomitent maximul.

Cercetările privind durata de coloraţie au indicat că legătura dintre galocianin şi cromalaun se face relativ lent şi că după 48 de ore nu se obţine încă intensitatea maximă a reacţiei. Cantitatea de colorant din ţesut este proporţională cu logaritmul duratei. Fixarea colorantului pe ţesut urmează o izotermă de absorbţie Langmuir. Pakkenberg (407) observă, după 16 ore de coloraţie, extincţia cea mai înaltă în citoplasma celulelor ganglionilor spinali. În cercetări personale de citofotometrie am obţinut rezultate optime cu o durată a coloraţiei de 96 de ore (209), (530), (531). Durata de coloraţie poate fi scurtată prin ridicarea temperaturii la 44—56°C, în acest caz putînd creşte şi coloraţia nespecifică (41).

Urmărind influenţa pH-ului asupra coloraţiei cu galocianin-cromalaun, Einarson (156), Lagerstedt (321) şi Stenram (509) constată că odată cu creşterea acestuia scade specificitatea colorantului pentru acizii nucleici. Se observă astfel că la pH 1,6 apare o coloraţie intensă a corpusculilor Nissl, la un pH mai crescut se colorează întreaga citoplasmă, iar la pH peste 2,0 limfocitele timice se colorează intens în albastru-violet.

Rolul fixării a fost investigat de Sandritter şi colab. (470), (471), (473). Limfocitele nefixate din timusul de viţel prezintă în coloraţia cu galocianin-cromalaun un conţinut de colorant de 8,4 AE („Arbeits-Einheiten", Sandritter), corespunzînd produsului extincţia × suprafaţa; după tratare cu soluţie NaCl 2,5%, conţinutul creşte la 10,3 AE, după fixare în alcool atinge 14,1 AE, iar după formol ajunge la 15,7 AE. Dimpotrivă, nucleii hepatocitelor nu prezintă diferenţe de colorabilitate cu galocianin-cromalaun în funcţie de fixatorul folosit. Includerea în parafină nu influenţează în nici un fel coloraţia.

Fibroblaştii fixaţi în formol prezintă un conţinut de culoare evaluat la 7 AE (473), (476), în timp ce acţiunea tamponului fosfat Sörensen (pH 6,5, 56°C, 2 ore) determină creşterea conţinutului de culoare la 9 AE. Tratarea cu ribonuclează atrage sporirea colorabilităţii la 10 AE. Este vorba de o punere în libertate a grupărilor fosfat, dat fiind faptul că îndepărtarea ARN are ca efect o scădere a colorabilităţii.

Legătura dintre galocianină şi acizii nucleici este foarte solidă; tratarea cu acizi şi baze puternice nu produce dizolvarea complexului acizi nucleici — colorant.

Trebuie menţionat că energia luminoasă, folosită în microspectrofotometrie, poate atrage modificări în proprietăţile de absorbţie ale colorantului. Dacă la nucleii coloraţi după tehnica Feulgen se constată dimi-

Scanned with OKEN Scanner

nuarea colorabilității după expuneri prelungite la sursa de lumină, în cazul coloraţiei cu galocianin-cromalaun valorile complexului colorant — acizi nucleici rămîn mai mult timp constante.

### Utilizarea nucleazelor

Folosirea nucleazelor în histochimie se datoreşte lui Brachet (56), (57). Ribonucleaza cristalizată este o dipolimerază care desface molecula de acid ribonucleic într-un mononucleotid dializabil şi într-un rest nedializabil. Este vorba de o proteină solubilă, termostabilă, de tipul albuminei, cu o greutate moleculară de 15 000, avînd activitatea optimă la pH 7—8,2 şi la 65°C. Specificitatea ribonucleazei în preparatele purificate este foarte bună : acidul dezoxiribonucleic, hidraţii de carbon şi grăsimile nu sînt atacate.

Activitatea enzimei este apreciată în funcţie de pierderea bazofiliei citoplasmei şi a nucleolului. Gradul de acţiune depinde în mare măsură de modalitatea de fixare : fixatorii cu crom, osmiu şi mercur dau rezultate slabe.

Dezoxiribonucleaza prezintă, ca şi ribonucleaza, proprietăţile unei depolimeraze. Rezultă fragmente de tipul tetranucleotidelor şi un rest nedializabil, bogat în adenină şi timină. Dezoxiribonucleaza este o proteină de tipul albuminei, termolabilă, cu o greutate moleculară de 60 000, activată de magneziu. Dezoxiribonucleaza este mai rar utilizată, deoarece ADN poate fi evidenţiat specific cu reacţia Feulgen.

## *Tehnici de coloraţie pentru evidenţierea proteinelor*

Metodele folosite pentru estimarea cantitativă a proteinelor cuprind : 1) reacţii specifice pentru evidenţierea aminoacizilor, ca reacţiile Millon şi Sakaguchi ; 2) metode de legare a coloranţilor acizi la aminoacizii esenţiali, lizina, arginina şi histidina ; 3) procedee pentru detectarea proteinelor cu punct izoelectric ridicat, cum sînt histonele şi protaminele.

### Reacţia Millon

Una dintre metodele cele mai vechi, folosite în histochimia proteinelor, utilizată relativ frecvent şi în studii citofotometrice, este reacţia Millon, bazată pe formarea derivaţilor nitrozomercuriali ai tirozinei (447), (566) care dau un produs de reacţie colorat cu maximul de absorbţie la 500 mμ.

Într-un studiu amplu asupra reacţiei Millon, Rasch şi Swift (437) au corelat absorbţia naturală a proteinelor la 280 mμ (datorită resturilor de tirozină şi triptofan) cu cantitatea de cromofor Millon, evidenţiată în diverse tipuri celulare. Autorii conchid că nu este posibil să se obţină o evaluare justă a reacţiei Millon datorită unor factori care grevează atît absorbţia în ultraviolet a proteinelor, cît şi cromoforul Millon. Rasch şi Swift (437) subliniază existenţa unor reacţii competitive apărute în

Scanned with OKEN Scanner

cursul metodei Millon, ca degradarea oxidativă a tirozinei și producția de compuși nitrozo și diazo. În general însă există o corelație relativ bună între absorbția în ultraviolet și formarea cromoforului Millon. În ultima vreme, reacția Millon este mai puțin utilizată datorită atît absorbției relativ scăzute a cromoforului, a stoichiometriei imperfecte, cît și a extinderii microscopiei de interferență, care permite estimarea masei totale de proteine.

## Reacția Sakaguchi

Un procedeu colorimetric foarte specific argininei este reacția Sakaguchi, în care α-naftolul sau hidroxichinolina se cuplează cu un hipohalit la gruparea guanidil a argininei într-un mediu puternic alcalin. Din cauză că reacția distruge țesuturile și pentru că produsul final colorat are o intensitate slabă, reacția a fost rareori folosită în studii microspectrofotometrice. Înlocuind α-naftolul cu 2,4-dicloro-α-naftol și hidroxidul de sodiu cu hidroxid de bariu, nedestructiv pentru țesuturi, Deitch (122) obține preparate intens colorate, la care rezultatele determinărilor citofotometrice pentru arginină concordă cu datele biochimice.

## Procedee de legare a coloranților acizi

Mecanismul predominant al reacției de evidențiere a proteinelor prin coloranți acizi este legătura electrostatică a anionilor colorați la grupările cationice disponibile ale proteinelor (121), ca grupările amino ale lizinei și hidroxilizinei, grupările guanidilice ale argininei, grupările imidazolice ale histidinei și grupările α-amino-terminale.

În citofotometria proteinelor bazată pe legătura coloranților acizi sînt necesare următoarele condiții: afinitate puternică a colorantului pentru grupările bazice ale proteinelor; concentrație ridicată a colorantului; pH ridicat spre a împiedica inhibarea legăturii colorantului prin ionii carboxilici competitivi; difuzabilitate mare a moleculei de colorant spre a fi legată de situsurile moleculei proteice.

Colorantul folosit în citofotometria proteinelor este naftolul galben S, sarea dipotasică a acidului flavinic. Un element care a contribuit la utilizarea acestui colorant în citofotometrie a fost observația că traseele de absorbție pentru preparate colorate cu Feulgen și cu acid flavinic sînt suficient de depărtate spre a evita suprapunerea zonelor de absorbție maximă. O acetilare blîndă blochează grupările bazice ale lizinei, astfel încît naftolul galben S colorează stoichiometric resturile dibazice ale aminoacizilor.

## Metode pentru histone și protamine

Dintre procedeele pentru colorarea proteinelor bazice o largă folosire în citofotometrie o are metoda lui Alfert (1), (2), (3), Alfert și Geschwind (5), precum și Bloch și Godman (47). Prin această tehnică, acizii nucleici

Scanned with OKEN Scanner

sînt extrași cu acid tricloracetic fierbinte, iar colorarea se face cu fast-green, 0,1% la pH 8,0—8,1. Reacția de culoare este de obicei limitată la nuclei. O reacție pozitivă este dată de asemenea de sediile de concentrare ale proteinelor citoplasmatice, ca granulele eozinofile ale leucocitelor, și de citoplasma celulelor bogate în ergastoplasmă, cum sînt plasmocitele. Alfert și Geschwind (5) subliniază că protamina, histonele, lizozimul și citocromul C sînt capabile să se coloreze cu fast-green la pH 8. Dintre acestea, numai histonele și protaminele se găsesc în nuclei, acestea din urmă putînd fi extrase prin hidroliza cu acid tricloracetic, folosită în îndepărtarea ADN.

În nucleoproteina nucleară majoritatea grupărilor fosfat, provenite din dubla helice a ADN, sînt neutralizate de către grupările bazice amino ale proteinelor nucleare. Dintre acestea mai importantă este histona cu un conținut bogat în arginină. Deși histonele constau probabil dintr-un grup mare de proteine similare, pot fi considerate ca o entitate, numărul grupărilor bazice ale acestora reflectînd într-o bună aproximație grupările fosfatice acide ale ADN pe care le ocupă prin legături saline.

Raportul dintre histone și ADN se consideră în general constant. Histonelor li se atribuie o funcție reglatoare a activității genelor.

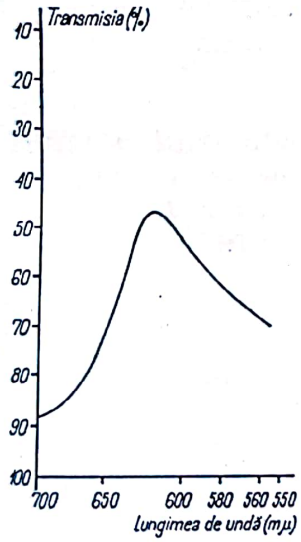



Fig. 15. — Spectrul de transmisie urmărit la UMSP I al unei celule bazale colorate cu fast-green din epiderma umană. Absorbția maximă la 640 mμ.

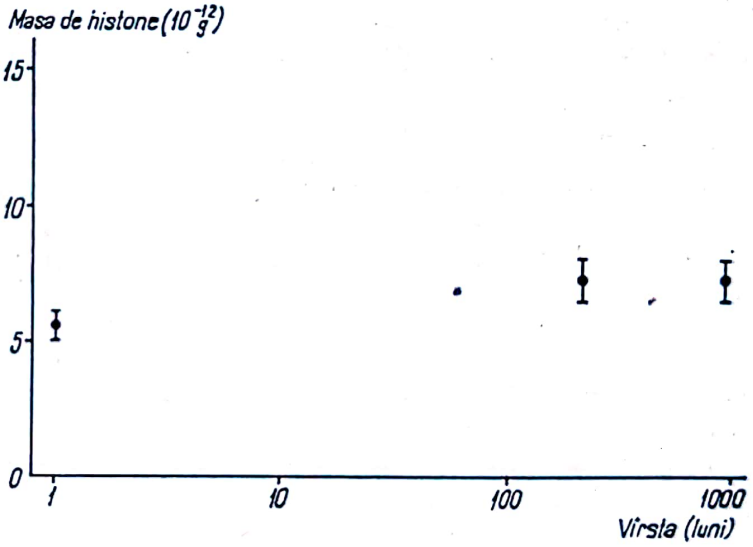



Fig. 16. — Relații între masa de histone și vîrstă. Histonele rămîn constante în cursul vieții.

După datele lui Alfert (1), (2), raportul Feulgen — fast-green este de 1,5—2. În nucleii picnotici și în eritrocitele nucleate heteropicnotice, raportul scade la 0,60—0,65 datorită probabil cantităților mai mici de proteine nehistonice. Invers, creșterea raportului a fost constatată de Bloch și Godman (47) în ficatul șobolanilor tineri, în celulele heterosintetice. Absorbția maximă a histonelor evidențiate cu fast-green are loc la 640 mμ (fig. 15).

Scanned with OKEN Scanner

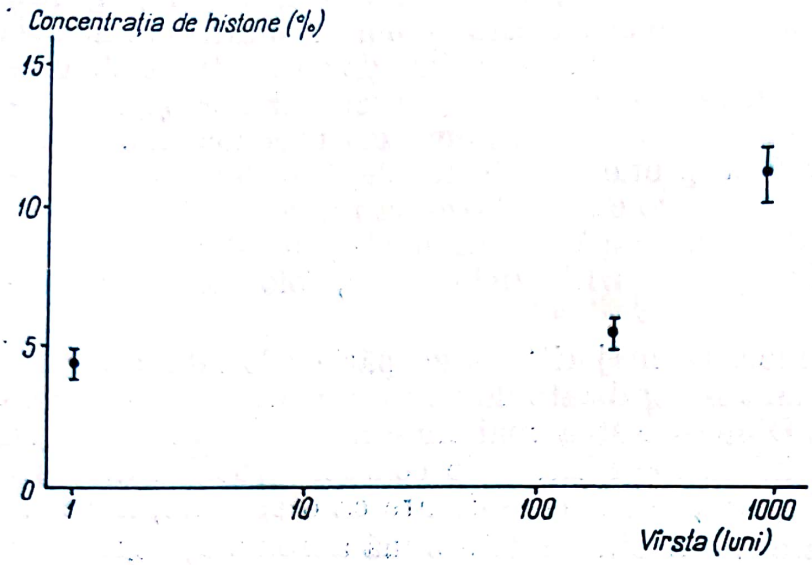



Fig. 17. — Creşterea concentraţiei histonelor în nucleii epidermei umane după 60 de ani.

În cercetări de citofotometrie efectuate pe epiderma umană am constatat că masa de histone este egală cu $7 \times 10^{-12}$ g şi că rămîne constantă în tot cursul vieţii (fig. 16). Dimpotrivă, concentraţia histonelor creşte după 60 de ani (fig. 17). Faptul ni se pare interesant, întrucît concentraţia acizilor nucleici nu suferă modificări în funcţie de vîrstă.

# 5. Microscopia de interferență

## Principiile microscopiei de interferență

Interesul pentru aplicațiile interferometriei în biologie a fost stimulat de lucrările lui Barer (29), Davies și Wilkins (118), Mellors (370), (371), care au indicat posibilitățile teoretice și practice de a estima cantitățile diferitelor substanțe celulare în afara apei legate fizic.

Sisteme de interferență au fost descrise de mult timp de către Jamin (1856), Sirks (1894), Pringsheim (1898), Fabry-Perot (1899), Signac (1911), însă instrumentele nu erau utilizabile din cauza puterii de rezoluție redusă. Odată cu îmbunătățirile substanțiale aduse de Lebedeff (331), Dyson (147), Smith (502), Johansson și Afzelius (293) și Grehn (215) au fost extinse și aprofundate cercetările de biologie. Mellors (370), Barer (30), (31), Davies și colab. (114) au arătat existența unei relații proporționale între diferența de cale, determinată interferometric, care servește ca index de refracție între obiect și mediu, pe de o parte, și concentrația specifică a substanțelor biologice, pe de altă parte. Această relație a fost definită în fizica gazelor și a fluidelor de Lorentz (1880), iar în chimia proteinelor de Robertson (1912) și de Adair și Robinson (1930).

## Evaluarea datelor în microscopia de interferență

Pentru calculul volumului și al masei uscate se utilizează următoarele formule :

$$\text{Volumul nuclear} = \frac{4}{3 \cdot \sqrt{\pi}} \cdot S_n \cdot \sqrt{\overline{S_n}} \cdot [\mu^3] \qquad [1]$$

$$\text{Volumul citoplasmei} = \frac{4}{3 \cdot \sqrt{\pi}} \cdot S_{tot} \cdot \sqrt{\overline{S_a}} \cdot \left(1 - \frac{\overset{n}{\Sigma} Vol_n}{Vol_{tot}}\right) [\mu^3] \qquad [2]$$

$$\text{Masa uscată a nucleului} = c_1 \cdot S_n \left(\varphi_n^0 - \varphi_{ci}^0 \sqrt{\frac{\overline{S_n}}{\overline{S_a}}}\right) + c_2 \, Vol_n \, [g] \qquad [3]$$

$$\text{Masa uscată a citoplasmei} = c_3 \cdot S_{tot} \cdot \varphi_{ci}^0 \left(1 - \frac{\overset{n}{\Sigma} Vol_n}{Vol_{tot}}\right) + c_4 \, Vol_{ci} \, [g] \qquad [4]$$

$S_n$ reprezintă suprafaţa nucleară ($\mu m^2$), iar $S_{tot}$, suprafaţa întregei celule ($\mu m^2$).

Volumul nuclear se calculează după formula elipsoidului. Suprafaţa nucleară se apreciază prin planimetrie sau după formula :

$$S_n = \pi ab \text{ (a, b fiind semiaxele).}$$

A treia semiaxă (c) se calculează după formula :

$$c = \sqrt{S_n}/\pi.$$

$S_a$ reprezintă suprafaţa aşa-zisei zone auxiliare ($\mu m^2$). Este vorba de aprecierea cantităţii de substanţă situată deasupra şi dedesubtul nucleului şi care defineşte grosimea celulei.

În calculul volumului citoplasmatic se estimează mai întîi volumul total al celulei, din care se extrage volumul nuclear :

$$c_1 \text{ şi } c_3 = \frac{\lambda \cdot k}{\chi \cdot 180^\circ} [g\,cm^{-2}] \qquad [5]$$

$$c_2 \text{ şi } c_4 = \frac{n_m - n_a}{\chi} [g\,cm^{-3}] \qquad [6]$$

$c_1$, $c_2$, $c_3$, $c_4$ sînt constantele de corecţie ale mediului de includere ;
k, constanta pentru corectarea sfericităţii nucleului şi celulei ;
$n_m$, indicele de refracţie al mediului ;
$n_a$, indicele de refracţie al apei ;
$\lambda$, lungimea de undă a luminii monocromatice utilizate (aici $\lambda$ = 5 462 Å) ;
$\chi$, refracţia specifică ($cm^3\ g^{-1}$), care de obicei este 0,18 $cm^3\ g^{-1}$ reprezentînd constanta din ecuaţia pentru calcularea diferenţei de cale $= \frac{\varphi \cdot \lambda}{180^\circ}$ cm ;
$\varphi_n$, unghiul de integrare la analizator pentru suprafaţa nucleară ;
$\varphi_{ci}$, unghiul de integrare la analizator pentru citoplasmă.

Calcularea greutăţii uscate a fost efectuată mai ales pe material viu, nefixat sau pe ţesuturi conservate prin congelare — desicare. La examinarea materialului fixat trebuie ţinut seama de incrementul specific, care depinde de indicele de refracţie şi de concentraţia proteinelor. Numeroase cercetări în acest domeniu au fost efectuate de Caspersson şi colab. (78), Davies şi Engström (116), Hale (225), Mellors (371), Sandritter (467), Sandritter şi Schiemer (475), Schiemer şi colab. (488). În cercetările pe celule vii se consideră că masa celulară are în medie un increment $\chi$ specific. Totodată se apreciază că valoarea lui $\chi$ reprezintă suma diferitelor incremente (ADN, ARN, proteine, săruri, lipide etc.) :

$$\Sigma_\chi = a_{\chi_1} + b_{\chi_2} + c_{\chi_3} \ldots$$

Factorii a, b, c caracterizează componenta corespunzătoare incrementului respectiv.

*Tabelul nr. 8*

**Greutatea uscată, conținutul în acizi nucleici și în lipide în celulele haploide și diploide (determinări interferometrice) (după Schiemer (485))**

| Specia animală | Celule investigate | Greutatea uscată $10^{-12}$g | Acizi nucleici $10^{-12}$g | Lipide $10^{-12}$g | Autori |
|---|---|---|---|---|---|
| Om | spermatozoizi | 6,08—6,38 | 3,12 | 0,49 | Sandritter și colab. (470) |
| | timocite | 21,7—13,8 | 6,80 | — | Sandritter și colab. (470) |
| Taur | spermatozoizi | 7,1—8,09 | 2,8—3,25 | 1,13 | Sandritter și colab. (470) Davies și colab. (114) Leuchtenberger (339) |
| Vițel | timocite | 14,4—33,0 | 6,55 | 1,46 | Hale (225); Hale și Kay (227); Sandritter și colab. (469) |
| Iepure | spermatozoizi | 6,71—6,79 | 3,25 | 0,67 | Sandritter și colab. (469) |
| | timocite | 13,02—13,53 | 2,26—2,35 | — | *idem* |
| Șobolan | spermatozoizi | 5,82—6,27 | 3,11 | — | *idem* |
| | timocite | 10,50—11,85 | 6,05 | — | *idem* |
| Șoarece | spermatozoizi | 16,0 | 3,0 | 3,0 | Mellors (370) |
| Cocoș | spermatozoizi | 2,49 | 1,59 | — | Mirsky și Ris (382) Sandritter și colab. (469) |
| | eritrocite | 7,17 | 3,30 | — | Sandritter (466) |
| Găină | eritrocite | 4,59—4,93 | 3,30 | 0,43—0,84 | *idem* |
| Broască *(R. temporaria)* | eritrocite | 21,55 | 8,85 | — | *idem* |
| Broască *(B. viridis)* | eritrocite | 18,03 | 12,12 | — | *idem* |
| Păstrăv | spermatozoizi | 4,01—5,16 | 2,52 | 0,56—0,65 | *idem* |
| | eritrocite | 8,36 | 5,46 | — | *idem* |
| Celule germinale diploide | | 29,0 | — | 6,0 | Mellors (370) |
| Fibroblaști embrionari | | 74,0 | 8,8 | — | *idem* |
| Celule sarcom Ma 387 | | 88,0 | 17,0 | — | *idem* |

Scanned with OKEN Scanner

Pentru materialul nefixat, indicele de refracţie este de 1,35—1,46, în timp ce în ţesuturile fixate acesta atinge 1,51—1,58, ceea ce atrage alte valori pentru $\chi$. Rezultă că microscopia de interferenţă este în special utilizabilă pentru investigarea ţesuturilor vii sau nefixate.

Din rezultatele sumarizate, după diferiţi autori, în tabelul nr. 8 rezultă că valorile masei uscate în celulele haploide faţă de cele diploide sînt în raportul 1 : 2. Dimpotrivă, greutatea uscată se deplasează spre valori superioare în celulele cu citoplasmă mai multă şi cu conţinut bogat de proteine nehistonice în nucleu. Din tabel reiese cu claritate că celulele haploide cu citoplasmă în cantitate mai mare au şi nuclei cu o greutate uscată sporită.

Posibilitatea determinării grosimii obiectelor biologice constituie o contribuţie de valoare a microscopiei de intereferenţă. În acest scop au fost propuse diferite metode de către Ambrose (10), Barer (31), Pehland şi Hager (417). Chaubal şi colab. (84) au discutat posibilitatea aplicării practice a metodei cu două lungimi de undă. S-a constatat că în aprecierea grosimii trebuie avută în vedere modificarea indicelui de refracţie a materialului concomitent cu lungimea de undă.

Exactitatea rezultatelor la microscopul de interferenţă rezultă şi mai bine din comparaţia datelor interferometrice cu cele microhistoradiografice şi biochimice (tabelele nr. 9 şi 10).

*Tabelul nr. 9*

**Date comparative interferometrice şi biochimice privind greutatea uscată în timocitele de viţel ($10^{-12}$ g) (după Hale şi Kay (227))**

| Nr. nucleilor cercetaţi | Date interferometrice | Date biochimice |
|---|---|---|
| 39 | 19,8 | 19,1 |
| 27 | 21,1 | 23,0 |
| 30 | 35,0 | 33,0 |
| 35 | 20,0 | — |
| 34 | 23,6 | — |
| 38 | 25,5 | — |

*Tabelul nr. 10*

**Date comparative interferometrice şi roentgenhistoradiografice privind determinarea greutăţii uscate ($10^{-12}$ g) (după Sandritter şi Müller (474))**

| Celule investigate | Date interferometrice | Date roentgenhistoradiografice |
|---|---|---|
| Spermatozoizi de taur | 8,94 ± 1,17 | 7,87 ± 0,46 |
| Timocite de taur | 14,40 ± 1,58 | 15,05 ± 0,53 |
| Eritrocite de broască (nucleu) | 21,55 ± 0,84 | 24,00 ± 0,69 |
| Epitelii plate din mucoasa bucală (nucleu) | 55,50 ± 2,6 | 70,36 ± 4,26 |

## *Aplicaţii ale microscopiei de interferenţă*

### Ţesutul epitelial pavimentos

În vagin, acest ţesut prezintă o greutate uscată nucleară medie de $40{,}6 \times 10^{-12}$ g. Pentru citoplasmă valoarea medie este de $949 \times 10^{-12}$ g (467). Raportul dintre greutatea uscată a nucleului şi a citoplasmei este aproximativ 1 : 22. Distribuţia de frecvenţă a masei pe unitatea de suprafaţă nucleară este în medie de $0{,}49 \times 10^{-12}$ g/$\mu^2$ faţă de $0{,}39 \times 10^{-12}$ g/$\mu^2$ cît se constată pentru citoplasmă. Rezultă că greutatea uscată crescută a

citoplasmei se datorește numai suprafeței mai mari : aria nucleară medie este de 77 $\mu^2$, în timp ce suprafața medie a citoplasmei este de 2 055 $\mu^2$. Corelînd greutatea nucleară uscată cu volumul nuclear se poate conchide că există o proporționalitate între cele două mărimi. Reprezentarea grafică a raportului între conținutul procentual al greutății uscate și volum relevă că este vorba de un proces exponențial.

Funcția exponențială privind volumul și greutatea uscată poate fi confirmată prin reprezentarea valorilor măsurate pe o scală dublă logaritmică. Rezultă un aranjament al valorilor sub forma unei drepte. Atare corelații au fost descrise pentru creșterea organismului și sînt cunoscute ca formula de creștere alometrică :

$$y = b \cdot x^{\alpha},$$

în care y reprezintă o parte din total (organ, în acest caz greutate uscată), iar x este organismul în întregime (respectiv volumul) ; $\alpha$ reprezintă exponentul somatic indicînd ascensiunea dreptei ; b este indicele inițial de creștere.

Greutatea uscată a epiteliului pavimentos vaginal este similară cu cea a epiteliului pavimentos bucal. S-au găsit valori de $55 \times 10^{-12}$ g ($0{,}65 \times 10^{-12}$ g/$\mu^2$) pentru greutatea uscată a nucleului și de $1\,041 \times 10^{-12}$ g ($0{,}48 \times 10^{-12}$ g/$\mu^2$) pentru cea a citoplasmei (473). În comparație cu aceste valori, conținutul în ARN și ADN, de $8 \times 10^{-12}$ g, apare relativ moderat. Rezultă că în nucleu numai 20 % din greutatea uscată este datorată acizilor nucleici, iar în citoplasmă doar 3 % din greutatea uscată corespunde ARN.

Cercetări efectuate pe frotiuri din epiteliul bucal relevă corelații interesante ale greutății uscate și volumului nuclear cu ciclul menstrual (489). Între a 5-a și a 9-a zi, greutatea uscată și volumul nuclear și citoplasmatic cresc, iar greutatea uscată (%) a nucleului scade. Între a 9-a și a 15-a zi cele două valori scad, în timp ce greutatea uscată nucleară (%) atinge maximul. Începînd din ziua a 15-a și pînă la sfîrșitul ciclului menstrual greutatea uscată și volumul nuclear și citoplasmatic cresc din nou. Modificări cariometrice similare au fost descrise în epiteliul bucal de către Witt (565) și în mucoasa vaginală de Malsch și Schmitt (354). Rezultă clar hormono-dependența greutății uscate nucleare și a modificărilor volumetrice nucleocitoplasmatice în cazul epiteliului bucal. Creșterea volumului nuclear și citoplasmatic, precum și a greutății uscate corespunde activității maxime a estrogenilor ; scăderea de la sfîrșitul ciclului se datorează eliminării de estrogeni și creșterii progesteronului.

## Fibrele miocardice

La om, conținutul în substanță uscată al fibrelor miocardice este de 12,5 %, iar la cobai de 10,6 % (474). Aceste valori sînt ceva mai mari decît în citoplasma epiteliilor ciliate (5,6 %) și a epiteliilor alveolare (4,5 %) și corespund nucleului epiteliului ciliat (9,4 %).

Scanned with OKEN Scanner

Greutatea uscată a fibrelor miocardice este aproape dublă în miocardul hipertrofiat ($399 \times 10^{-12}$ g) față de cordul normal ($200 \times 10^{-12}$ g).

Volumul fibrei miocardice crește în cursul hipertrofiei însă nu în aceeași măsură cu greutatea uscată, încît se poate conchide că este vorba de o creștere a concentrației masei, care evoluează în același sens cu a concentrației mesei pe unitatea de suprafață ($g/\mu^2$) și concomitent cu conținutul procentual al greutății uscate (la individul normal 12%, în hipertrofie 15%). Este vorba probabil de o creștere a actomiozinei pe seama proteinei insolubile necontractile din stromă. Greutatea sporită a cordului hipertrofic se datorește deci creșterii volumului și greutății fiecărei fibre. Se constată de asemenea o creștere de 3% a concentrației de substanțe. Această creștere a greutății uscate a fibrelor izolate nu prezintă o corelație strictă cu mărirea cordului, deoarece la o creștere a miocardului cu 475—920 g, greutatea uscată a fibrelor atinge o limită de aproximativ $400—440 \times 10^{-12}$ g. Se poate conchide că mărimea greutății fibrelor izolate este limitată prin insuficiență metabolică și că hipertrofia miocardică are loc prin înmulțirea fibrelor.

În contrast cu hipertrofia, în atrofie se constată o scădere a greutății și volumelor fibrelor, precum și a conținutului procentual în substanțe.

Măsurătorile conținutului în ADN arată un procent de 97 nuclei tetraploizi în miocardul normal. Odată cu apariția hipertrofiei cardiace crește numărul de celule octoploide. Conținutul în ADN crește de la 31 la 82%. Rezultă că stimularea funcțiilor celulare determină o poliploidizare endomitotică a conținutului în ADN de la 4 la 8 C. Această poliploidizare începe de la o greutate de 500 g a cordului (greutatea critică după Linzbach (343)). Apariția de nuclei cu un conținut în ADN de 12 C, corespunzînd unei greutăți a cordului de 720 g, este probabil corelată cu aspectele regeneratorii ale miocardului.

## Limfocitele sanguine

Masa nucleară uscată a limfocitelor sanguine este de $48 \times 10^{-12}$ g. În comparație cu aceasta, limfoblaștii obținuți de la bolnavi cu leucemie au o greutate nucleară uscată mult crescută (în medie $90 \times 10^{-12}$ g). Suprafața nucleilor limfocitelor leucemice este foarte apropiată de a limfocitelor circulante normale. Rezultă că sporirea în greutate se datorește numai creșterii masei uscate. Acest fapt rezultă și din urmărirea valorilor greutății uscate (masă/unitate de volum), care reprezintă 27% în limfoblaști față de 18% în limfocitele normale.

Masa uscată a nucleilor din leucemiile acute prezintă o dispersie accentuată a valorilor datorită etapelor variate ale sintezei proteice și de acizi nucleici. În această populație celulară în creștere sînt cuprinse celule premitotice care și-au dublat masa. Cercetările lui Lampert (325) au dovedit că celulele leucemice au o masă nucleară uscată sporită, chiar dacă prezintă un conținut în ADN diploid, deci un număr normal de 46 de cromozomi. Rezultă că celulele leucemice conțin mai multe proteine decît celulele

Scanned with OKEN Scanner

normale. Dacă se consideră proteinele nucleare ca represoare genetice și ca o expresie genetică diminuată datorită înmulțirii represorilor celulari, atunci se poate avansa ipoteza că dediferențierea celulelor leucemice are loc nu printr-o dezinhibare, ci printr-o reprimare a funcțiilor genetice prin cantitatea prea mare de proteină represoare.

## Boala canceroasă

Utilizarea microscopiei de interferență în patologia tumorală a adus în ultimul timp date foarte interesante. Comparînd masa uscată a celulelor normale cu a celor neoplazice, reiese că nucleii neoplazici posedă o masă uscată inegală, în general mai mare (tabelul nr. 11).

Dacă raportăm masa uscată a nucleilor și a celulelor la volumul corespunzător, în sistemul dublu logaritmic, valorile apar situate pe o linie dreaptă. Reprezentarea este cea obișnuită pentru creșterea alometrică,

*Tabelul nr. 11*

**Volumul nuclear, greutatea uscată și greutatea uscată procentuală în nucleii și citoplasma unor celule normale și neoplazice (1 130 de celule) (după Schiemer 487))**

| Material cercetat | Nucleu | | | | Citoplasmă | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | volum $\mu^3$ | greutate uscată $10^{-12}$g | greutate uscată % | n | volum $\mu^3$ | greutate uscată $10^{-12}$g | greutate uscată % |
| Mucoasa bucală | 39 | 651 | 55,5 ± 16 | 9,1 | 37 | 43,9 × $10^3$ | 1 941 ± 381 | 4,5 |
| Mucoasa bucală | 51 | 478 | 55,9 ± 17 | 11,1 | 51 | 20,2 × $10^3$ | 1 080 ± 175 | 5,5 |
| Epiteliul cilindric | 42 | 447 | 41,1 ± 16 | 9,4 | 41 | 1 629 | 93 ± 45 | 5,7 |
| Valoarea medie a celulelor normale | 132 | 519 | 51,1 | 10,1 | 129 | 21,1 × $10^3$ | 1 010 | 5,3 |
| Cancer bronșic cu celule mici | 281 | 461 | 34,5 | 8,2 | | | | |
| Cancer epitelial fără cornificări | 208 | 2 609 | 184,5 | 10,4 | 175 | 4 591 | 193 | 4,7 |

anterior expusă. Exponentul $\alpha$ are valoarea 0,43—0,72 pentru nucleii normali. Nucleii neoplazici prezintă în general valori mult mai mari.

Scanned with OKEN Scanner

Indicele de creştere (b) este de 0,64—0,44 la celulele normale, dar ajunge la valori mult mai reduse, pînă la 0,04, în celulele tumorale. Raportul N/P pentru volumele elementelor normale este de 1 : 72 pînă la 1 : 41; pentru masa uscată raportul N/P este între 1 : 34,5 şi 1 : 23. Relaţia pentru volum şi greutate uscată este aproximativ 1 : 2. În celulele neoplazice, raportul N/P este pentru volume 1 : 2,7—1 : 1, iar pentru masa uscată valorile oscilează între 1 : 1,4 şi 1 : 0,46 (tabelul nr. 12).

*Tabelul nr. 12*

**Raportul N/P pentru volum şi greutate uscată în corelaţie cu exponentul somatic pentru nucleu şi citoplasmă (după Schlemer (487))**

| Material cercetat | n | Nucleu | Citoplasmă | Raport N/P | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | volum | masă uscată |
| Epiteliul mucoasei bucale | 39 | 0,49 | 0,61 | 1 : 71,5 (0,014) | 1 : 34,5 (0,029) |
| Epiteliul mucoasei bucale | 51 | 0,72 | 0,93 | 1 : 43,5 (0,023) | 1 :19,3 (0,052) |
| Epiteliul ciliat (bronşic) | 66 | 0,43 | 0,44 | 1 : 41 (0,24) | 1 : 23 (0,44) |
| Carcinom pavimentos necornificat | 57 | 0,5 | 0,81 | 1 : 1,8 (0,56) | 1 : 0,62 (1,62) |
| Adenocarcinom rect | 21 | 0,74 | 0,95 | 1 : 1,8 (0,55) | 1 : 0,49 (2,2) |
| Carcinom gastric solid nediferenţiat | 33 | 0,44 | 1,00 | 1 : 2,3 (0,44) | 1 : 0,88 (1,14) |

Scanned with OKEN Scanner

# 6. *Microscopia cu raze X*

O tendinţă extrem de modernă în biologie este studiul funcţiilor materiei vii la nivel molecular. Determinarea structurii moleculare tridimensionale a mioglobinei, a structurii dublu helicale a ADN, structura virusurilor şi a bacteriilor şi relaţiile cu funcţiile celulare sînt numai cîteva exemple de cercetare în domeniul biologiei moleculare. În ultimele decade histo- şi citochimia cantitativă au cunoscut o expansiune vertiginoasă datorită introducerii unor metode de mare fineţe, care se pot grupa în chimice, fizice şi biologice. Prima categorie cuprinde : reacţiile de culoare citoenzimatice, ultramicrocolorimetria şi microgasometria. În grupul tehnicilor fizice intră măsurătorile de microabsorbţie cu radiaţii electromagnetice, histospectrografia, tehnicile izotopice, microinterferometria, microcristalografia etc. Al treilea grup include demonstrarea microscopică a anticorpilor şi unele tehnici microbiologice aplicate la microscop. Toate aceste metode au comun faptul că pot estima cantităţi foarte mici de substanţă, unitatea de greutate fiind $\mu$ $\mu$g ($10^{-12}$ g), ceea ce corespunde greutăţii unui $\mu^3$. Dintre metodele noi folosite în citochimia cantitativă un loc important îl ocupă microscopia cu raze X. În tabelul nr. 13 sînt prezentate informaţiile pe care le obţinem cu raze X în biologia celulară.

## *Formarea imaginilor la raze X*

Dintre metodele de microscopie la raze X, mai des utilizate sînt : microradiografia de contact, microscopia de proiecţie, microscopia de reflecţie, microscopia cu „scanning".

*Microradiografia de contact.* Aceasta se bazează pe principiul historadiografiei : un obiect biologic plasat în contact strîns cu o emulsie fotografică fin granulară este fotografiat la raze X.

Acţiunea de fotografiere a razelor X este cunoscută de mult timp. Înnegrirea emulsiei fotografice depinde de : mărimea granulaţiilor, grosimea emulsiei, lungimea de undă a razelor X.

*Microscopia de proiecţie.* În acest scop se folosesc lentile electronice care produc un focar de raze X sub o jumătate de micron în diametru şi cu o strălucire specifică ridicată. În practică, microscopia de proiecţie are aplicaţii mai ales în studierea metalelor, mai puţin însă în biologie.

*Microscopia de reflecţie.* Razele X nu diferă în principiu de razele de lumină. Microscopul de reflecţie construit de Kirkpatrik este util nu numai pentru observarea probelor, dar şi pentru a genera un focar foarte



Scanned with OKEN Scanner

*Tabelul nr. 13*

**Metode microanalitice cu raze X**

| Dimensiunea μ | Greutatea | Structura biologică | Metoda de vizualizare | Metode de analiză chimică *in situ* | Informaţii obţinute |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 000—100 | $10^{-3}$—$10^{-6}$ | grupe de celule, organisme mici, organe mici | ochiul liber; microscop cu măritor mic, raze X | chimice, fizice | |
| 100—10 | $10^{-6}$—$10^{-9}$ | celule izolate, protozare | microscopie optică şi cu raze X | chimice, optice, analiza absorbţiei la raze X | aspectul structural şi compoziţia chimică ale structurilor observate |
| 10—1 | $10^{-9}$—$10^{-12}$ | celule mici, organite | microscopie optică şi cu raze X | absorbţie, emisie şi difracţie la raze X, absorbţie optică; | |
| 1—0,1 | $10^{-12}$—$10^{-15}$ | detalii celulare, microorganisme | optică, raze X, microscopie electronică | absorbţie la raze X; absorbţie optică | |
| 1 000—100A | $10^{-15}$—$10^{-18}$ | detalii celulare fine, virusuri | microscopie electronică, difracţie cu raze X | microscopie electronică | organizare macromoleculară şi moleculară |
| 100—1 A | $10^{-18}$-greutatea unui singur atom | detalii fine celulare, macromolecule, structuri moleculare | microscopie electronică, difracţie cu raze X şi electroni | microscopie electronică (pînă la un anumit nivel) | |

fin de raze X, de mare intensitate, utilizat în experienţe de microiradiere a unei celule sau părţi dintr-o celulă.

*Microscopia cu „scanning"*. Principiul acestui microscop constă în faptul că o sursă de raze X se obţine prin focalizarea electronilor pe o foaie subţire de metal, ca şi în cazul microscopului de proiecţie. Ţinta opreşte electronii, dar transmite razele X generate de impactul cu aceştia. Această ţintă este totodată măturată de fasciculul electronic. Sistemul are asemănări cu microradiografia de contact, dar în loc de a se obţine imaginea pe film, se utilizează baleiajul spre a transforma energia razelor X transmisă de fiecare punct de pe obiect în imaginea vizibilă.

## *Aplicaţii ale microradiografiei*

Microradiografia secţiunilor din ţesuturile calcificate a adus noi informaţii privind distribuţia sărurilor minerale în os şi în ţesuturile impregnate cu calciu.

Studiul sistemului microcirculator a permis observaţii atît în legătură cu diferite procedee experimentale, cît şi în urmărirea vindecării

rănilor ori al efectului căldurii sau frigului. Cantităţile de calciu au fost determinate în plăcile de aterom şi în sistemele haversiene. În piele s-a dozat sulful în diferitele straturi, iar rezultatele au fost corelate cu stadiile de creştere şi de organizare macromoleculară ale structurilor cheratinizate.

Contribuţii importante au fost aduse de Diculescu şi colab. la citotopochimia cantitativă inframicroscopică a calciului, utilizînd metode de o extremă fineţe care pot sesiza cantităţi de $10^{-15}$ g. Pe lîngă studierea particularităţilor de localizare subcelulară ale acestui ion, cercetările deschid noi perspective în patogenia hipo- şi hipercalcemiilor.

Microradiografii ultramoi au fost utilizate într-un mare număr de cercetări citochimice. Cantitatea de masă uscată pe unitatea de suprafaţă şi unitatea de volum a fost determinată în organitele unui mare număr de celule. Fibrele nervoase, celulele nervoase, fibrele musculare, cromozomii giganţi, celulele epiteliale şi multe alte tipuri celulare au fost analizate prin microradiografie cantitativă.

Tehnica de cîntărire a celulelor şi ţesuturilor la raze X şi procedeele microinterferometrice dau rezultate comparabile, aşa cum se constată în tabelul nr. 14.

*Tabelul nr. 14*

**Comparaţie între metoda cu raze X şi metoda interferometrică pentru determinarea masei (după Davies şi colab. (116), (117))**

| Material | $\mu\,\mu g/\mu^2$ | |
|---|---|---|
| | raze X | interferenţă |
| Piele umană | | |
| Stratul cornos | | |
| 1 | 2,7 | 2,5 |
| 2 | 3,0 | 2,9 |
| 3 | 3,2 | 2,9 |
| 4 | 3,0 | 2,9 |
| Stratul mucos | | |
| 5 | 1,3 | 1,4 |
| 6 | 0,9 | 1,0 |
| 7 | 1,0 | 1,2 |
| Aorta (iepure) | | |
| 1 | 1,7—1,8 | 1,3 |
| 2 | 1,7 | 1,2 |
| Mucoasa gastrică (cîine) | | |
| Celule parietale | 0,8—1,0 | 0,8—1,3 |
| Celule principale | 2,3—2,6 | 2,2—2,8 |
| Foliculi tiroidieni (şobolan) | | |
| 1 | 1,4 | 1,5 |
| 2 | 1,4 | 1,4 |
| 3 | 1,8 | 2,0 |
| 4 | 1,8 | 1,7 |
| 5 | 1,6 | 1,7 |
| 6 | 1,7 | 1,9 |
| 7 | 1,4 | 1,9 |
| 8 | 1,5 | 1,9 |

Scanned with OKEN Scanner

# 7. Citofluorimetria

## Principiile metodei citofluorimetrice

Microscopia de fluorescenţă a devenit o tehnică de morfologie cantitativă importantă, în special din cauza sensibilităţii şi simplităţii sale.

Se poate compara principiul fluorometriei cu cel al absorbţiei în soluţii, care se bazează pe legea Lambert-Beer. În cazul fluorometriei soluţia este excitată cu lumină ultravioletă sau vizibilă şi emite o lumină fluorescentă cu lungime de undă mai mare. Nu există o relaţie simplă între intensitatea excitaţiei (I exc.) şi intensitatea luminii fluorescente (I fl.). Rezultă că numai I fl. este măsurată şi deci calcularea concentraţiei nu este posibilă. Fluorometria este aşadar utilizată pentru determinări comparative ale soluţiilor cu concentraţii diferite prin măsurarea intensităţilor lor de fluorescenţă. Dacă sînt necesare valori absolute ale concentraţiilor, acestea se compară cu un standard de concentraţie cunoscută.

Pentru aspectul cantitativ I fl. trebuie să fie proporţională cu concentraţia (C), condiţie realizată numai cînd absorbţiile luminii de excitaţie şi ale luminii emise sînt joase.

De un mare interes este sensibilitatea metodei fluorimetrice. În fotometria de absorbţie limita inferioară este dată de acurateţea de a măsura mici diferenţe ale intensităţilor de lumină. În fluorometrie această limită este determinată în special de strălucirea sursei de lumină şi de sensibilitatea fotomultiplicatorului la micile intensităţi de lumină. Folosind un echipament comparabil, fluorometria este de 100 de ori mai sensibilă decît fotometria de absorbţie.

Să considerăm o particulă mică ce urmează să fie fotometrată. Particula respectivă absoarbe dar şi difuzează lumina. Din această cauză distribuţia luminii în jurul particulei este heterogenă. Majoritatea luminii difuzată intră în obiectivul microscopului; o parte mai mică se pierde şi dă naştere aşa-zisei absorbţii nespecifice. Acest efect depinde de mărimea particulelor, diferenţa indicilor de refracţie ai obiectului şi mediului, lungimea de undă a luminii şi apertura numerică a obiectivului. Erorile absorbţiei nespecifice sînt, în general, mai importante în lumină ultravioletă decît în lumină vizibilă. Dimensiunile celei mai mici particule care permite măsurători de absorbţie corecte este aproximativ de trei ori lungimea de undă.

O particulă fluorescentă se comportă cu totul diferit, ca un obiect autoluminos, emiţînd lumină fluorescentă în toate direcţiile. Teoretic nu există limită inferioară pentru mărimea particulelor izolate măsurabile în citofluorometrie. În practică, această limită este dată de cuantumul substanţei, sensibilitatea receptorului la lumină, intensitatea luminii la excistaţie. Se pot astfel măsura particule cu dimensiunea de 0,2 μ.

Scanned with OKEN Scanner

Microspectrofotometria de fluorescenţă s-a dezvoltat ca o metodă de mare fineţe care evidenţiază cantităţi infinitesimale de substanţe în celulele vii, prezervînd structurile subcelulare şi celulare. Compuşii biochimici pot fi identificaţi, localizaţi şi studiaţi în stare nativă *in situ*.

Substanţele utilizate în microscopia de fluorescenţă sînt în acelaşi timp coloranţi vitali şi fluorescenţi. Colorantul, ca substanţă străină celulei, furnizează informaţii fără a afecta fiziologia celulară.

Un mare număr de fluorocromi metacromatici pot fi folosiţi drept coloranţi citologici. Mulţi dintre aceştia sînt şi coloranţi vitali. Este necesar ca datele obţinute cu coloranţii fluorescenţi în celule să poată fi exprimate în aceiaşi termeni, ca şi cei folosiţi în cercetările chimice ale soluţiilor, înainte de a explora proprietăţile substanţelor metacromatice ca agenţi citochimici. Astfel acridin-oranjul (AO) a fost introdus în citologie cunoscîndu-se rezultatele investigaţiilor fizico-chimice.

Zanker (570), studiind spectrele de absorbţie şi de fluorescenţă ale AO în soluţie apoasă, constată pentru forma monomerică un maxim de absorbţie la 490 nm şi un vîrf al fluorescenţei la 535 nm ; forma polimerică la concentraţii mai mari prezintă maximul de absorbţie la 455 nm şi vîrful de emisie la 660 nm. Studii recente atestă că între AO şi acizii nucleici (AN) se dezvoltă cel puţin doi complecşi distincţi. Atunci cînd raportul dintre colorant şi AN este mic, complexul format (complexul II) are o absorbţie maximală la 502 nm în comparaţie cu maximul de 490 nm al colorantului simplu în stare monomerică. Aceşti complecşi sînt relativ stabili în raport cu starea ionică, temperatura şi constanta dielectrică. Cînd cantitatea de AO este sporită în raport cu AN se formează un alt complex (complexul I) mai puţin stabil, care absoarbe la 465 nm. Se observă modificări şi în privinţa spectrelor de emisie de fluorescenţă ale celor două complexe : complexul I are o emisie maximă la 660 nm, iar complexul II un maxim la 540 nm.

Coloraţia vitală introdusă de Ehrlich în 1909 a suscitat un mare interes prin posibilităţile de a evidenţia celulele *in vivo*. Rezultatele au fost însă limitate, deoarece nu se puteau colora decît celulele sistemului reticuloendotelial. Mai tîrziu au fost folosite diaminoacridinele pentru colorarea nucleoproteinelor, însă fără a putea diferenţia ribonucleoproteinele de dezoxiribonucleoproteine. Diaminoacridinele variază considerabil în privinţa toxicităţii, duratei de coloraţie a nucleului, strălucirii fluorescenţei. Acridin-oranjul s-a dovedit cel mai puţin toxic dintre coloranţii folosiţi.

Există diferenţe importante între materialul fixat şi celulele vii în privinţa colorării cu diaminoacridine. Citoplasma celulelor vii colorate cu diaminoacridine este foarte slab fluorescentă, în timp ce nucleul prezintă o fluorescenţă intensă. În culturi, citoplasma celulelor fixate sau lezate se colorează în roşu cu concentraţii scăzute de colorant, în timp ce în celulele vii se constată fluorescenţa strict limitată la materialul intranuclear. Diferenţa de comportament ar putea fi atribuită fie denaturării ARN citoplasmatic (mai puţin stabil decît ADN nuclear), fie unor noi posibilităţi ale ARN de a stabili legături cu acridin-oranjul. Probabil că amestecul AO—ADN determină numai o fluorescenţă verde, iar complexul AO—ARN produce numai fluorescenţă roşie.

Aspectele teoretice ale microfluorimetriei au fost discutate de Böhm şi Sprenger (52), Mac Carthy şi Moyar (351) etc.

Scanned with OKEN Scanner

## *Aplicații ale citofluorimetriei*

Cu ajutorul metodelor de fluorescență a fost localizată porfirina în schelet, s-a identificat riboflavina în epiteliul ochiului de la pești și mamifere și au fost elaborate trepte ale intensității de fluorescență ca funcție a lungimii de undă.

Microfluorimetria are o mare semnificație în relație cu imunofluorescența. Utilizarea unui reactiv Schiff fluorescent în reacțiile Feulgen și PAS permite cantificarea microfluorimetrică a ADN (51), (52) și a materialului PAS pozitiv, ca glicogenul. Alegerea unui reactiv fluorescent pseudo-Schiff a fost investigată de Prenna și Bianchi (429), Ruch (458), Böhm și Sprenger (52). Sînt preferați fie reactivul Schiff clasic (cu pararozanilină) utilizat ca fluorocrom, fie acriflavina, auramina O, corifosfina, acridinoranjul, bis-aminofenil-oxidiazolul (BAO). Microfluorimetria a fost de asemenea aplicată la cantificarea argininei, lizinei, histoanelor nucleare și proteinelor totale. Modificările spectrale în fluorescența fluorocromilor legate de variate substraturi pot da informații utile asupra legăturii substrat — colorant. Cea mai utilă aplicație a acestui principiu este măsurarea metacromaziei fluorescente (69), (443), (456).

Metodele de fluorescență sînt în special indicate pentru studii cinetice în țesuturile vii și în secțiuni nefixate, din cauza marii sensibilități obținute. Chance (82) a elaborat tehnici pentru studiul enzimelor oxidative în celulele vii, măsurînd modificările fluorescenței piridinnucleotidului redus (NADH) legat de proteine, prin folosirea unui microfluorimetru diferențial. Rotman și Papermaster (457) au constatat că celulele vii dintr-un mediu conținînd unii esteri fluoresceinici ai acizilor grași devin fluorescenți. Fenomenul se datorează esterilor nepolari care, trecînd prin membrana celulară, sînt hidrolizați de esterazele intracelulare, producînd fluoresceină liberă. Aceasta, fiind polară, nu poate trece prin membrană și se acumulează în celule. Fenomenul permite investigarea cinetică a proprietăților membranei celulare (457), (497).

Folosirea secțiunilor la criostat pentru studii enzimatice cinetice are unele avantaje în comparație cu utilizarea enzimelor în soluție. De exemplu, fosfataza alcalină poate fi obținută în soluție prin procedee violente, ca autoliza sau extracția cu n-butanol, dat fiind faptul că este strîns legată de elementele structurale celulare. Aceste procedee extractive sînt potențial distructive pentru structurile enzimatice.

Au fost dezvoltate tehnici pentru determinarea acidului pteroilglutamic, beta-glucuronidazei, beta-glucozidazei, precum și microadaptări pentru adrenalină, noradrenalină, serotonină, tirozină, triptamină etc. Marea sensibilitate a metodelor fluorometrice permite folosirea unor probe foarte diluate și în același timp elimină intervenția inhibitorilor, a reacțiilor nedorite sau pierderea produsului prin acțiunea altor enzime.

Numeroase publicații au atras atenția asupra extremei versatilități a determinării piridinnucleotidului pentru aprecierea enzimelor, substratelor, cofactorilor în cantități minime. Detaliile metodelor variază, dar evidențierea fluorimetrică se bazează pe faptul că DPN și TPN nu prezintă fluorescență, sînt distruși de substanțele slab alcaline, însă, după alcaline puternice sau condensare cu metil-etil-cetona în alcalii, dezvoltă o fluorescență marcantă. DPNH și TPNH sînt fluorescente, sînt distruse

Scanned with OKEN Scanner

de acidul clorhidric, iar fluorescența lor nativă este numai de 1/10 din cea rezultată din oxidarea lor în DPN sau TPN prin tratamentul cu alcaline puternice sau condensare cu metil-etil-cetona.

Determinarea activității enzimatice cu ajutorul tehnicii cu piridin nucleotid se poate ilustra prin următorul exemplu :

$$\text{oxalacetat} + \text{DPHN} \xrightarrow[\text{DHM}]{} \text{malat} + \text{DPN},$$

unde activitatea enzimatică poate fi determinată fie prin măsurarea dispariției DPNH, cu pierderea fluorescenței native, fie prin aprecierea formării de DPN și a fluorescenței sale după tratament cu alcaline puternice. Dacă reacția precedentă este cuplată cu reacția :

$$\alpha\text{-cetoglutarat} + \text{aspartat} \xrightarrow[\text{transaminază}]{} \text{glutamat} + \text{oxalacetat},$$

se poate determina transaminaza.

În același mod au fost utilizate reacțiile pentru glucozo-6-fosfat-dehidrogenază, DPN-pirofosfatază, DPN-diaminază, DPN-kinază etc.

Scanned with OKEN Scanner

# 8. Filmul-substrat ca metodă de citochimie cantitativă

Van Duijn şi van der Ploeg (146) au pus la punct o metodă cu aplicabilitate generală bazată pe utilizarea filmelor de celuloză sau poliacrilamidă ca substrat pentru substanţa histochimică ce urmează să fie investigată. Filmele de celuloză se prepară dintr-o soluţie alcalină de xantogenat de celuloză (viscoză) cu ajutorul mediilor acide de developare. Înaintea developării, viscoza este răspîndită cu un cilindru într-un strat subţire de 0,1—0,5 mm pe o suprafaţă de sticlă; distanţa dintre cilindru şi sticlă şi viteza cilindrului determină grosimea filmelor (30—150μ). Variaţiile în ultrastructura filmelor (transparenţa şi mărimea porilor) se pot obţine prin modificarea procedeului de preparare a viscozei sau prin schimbarea compoziţiei mediului de developare. În cazul testării unui compus macromolecular, acesta se amestecă cu viscoza înaintea developării. Datorită alcalinităţii viscozei pot fi încorporaţi numai compuşi stabili la pH ridicat. Această modalitate a fost utilizată numai pentru ADN. Coloraţia filmelor cu Feulgen relevă prezenţa unor mici vacuole de ADN răspîndite printre moleculele de celuloză. Filmele de celuloză sînt recomandabile şi pentru studiul compuşilor moleculari cu greutate mică, cum sînt grupările de aminoacizi şi bazele acizilor nucleici.

Un alt tip de filme este cel din poliacrilamidă. Mărimea porilor acestor filme poate fi astfel reglată încît substanţele macromoleculare, ca acizii nucleici, proteinele şi carbohidraţii, să fie imobilizate în matricea de gelatină, în vreme ce substanţele cu greutate moleculară joasă pot difuza cu uşurinţă. O polimerizare la 0°C atrage o uşoară inactivare a enzimelor. Procedeul are aplicaţii largi în studiul enzimelor şi izoenzimelor.

## Aparatura necesară determinărilor cantitative pe filmul-substrat

Absorbţia în filmele colorate poate fi măsurată cantitativ într-un colorimetru a cărui principală piesă este reprezentată de un suport metalic pentru introducerea filmului, care poate fi deplasat vertical în dreptul celulei fotoelectrice (146), (420). Absorbţia la o anumită lungime de undă depinde nu numai de concentraţia cromoforelor, ci şi de grosimea filmului. În acest scop fragmentul de film situat, în faţa aperturii pe care o străbate raza de lumină se perforează, se usucă şi se cîntăreşte. Cunoscînd concentraţia compusului investigat, devine posibilă exprimarea absorbţiei cantităţii compusului colorat.

Scanned with OKEN Scanner

## *Aplicații ale citochimiei cantitative pe filmul-substrat*

Primele cercetări au fost efectuate pe ADN încorporat în filmele de celuloză. S-a constatat o relație liniară între absorbție și cantitatea de ADN după colorație cu pararozanilină-Schiff. Corelația între absorbție și conținutul ADN inițial al filmului este mai puțin perfectă, datorită faptului că un procentaj variabil de ADN (20—30%) se pierde în timpul hidrolizei. Încorporarea de dezoxiribonucleoproteină (DNP) împreună cu 5% albumină bovină în poliacrilamidă realizează un film care, colorat cu Feulgen, prezintă un spectru cu totul asemănător nucleilor din frotiuri sau țesuturi, avînd maximul de absorbție la 565 μm.

Aplicarea colorimetriei fotografice pe amprente sau frotiuri colorate cu Feulgen concomitent cu filme conținînd ADN, în vederea cantificării acestei substanțe, a dat rezultate asemănătoare dozărilor biochimice (125), (146). Investigații similare au fost efectuate utilizînd citofotometria cu două lungimi de undă.

Încercări promițătoare au fost efectuate pentru cantificarea activităților enzimatice folosind dozările pe filme. A fost dozată activitatea aminopeptidazei, a fosfatazei alcaline, a lactoperoxidazei. Recent au fost publicate rezultate privind dozarea dehidrogenazelor piridinnucleotid-dependente (394), utilizînd metoda filmelor cu agaroză. Tehnica are următoarele avantaje : reacția de culoare este independentă de prezența tetrazolium -reductazelor endogene, iar artefactele datorate difuzării și extracției enzimelor solubile sînt înlăturate. Pentru obținerea rezultatelor se cer îndeplinite cîteva condiții, și anume 1) validitatea legii Lambert-Beer ; 2) concentrații optime ale substratelor, cosubstratelor și coloranților în reacția din film spre a se evita limitarea reacției prin difuzia insuficientă a acestor compuși ; 3) proporționalitatea între concentrația locală de enzime și datele obținute ; 4) specificitatea reacției demonstrată prin rezultate negative în absența substratului sau în prezența inhibitorilor. Validitatea metodei a fost urmărită și prin compararea rezultatelor cu dozările microfotometrice în omogenate.

Pentru determinările microfotometrice s-a folosit un microfotometru Leitz cu monocromator și diafragm variabil, combinat cu un fotometru înregistrator Eppendorf și un fotomultiplicator. Lumina este furnizată de o lampă de cuarț. Determinările au fost efectuate în lumină monocromatică la 546 μm.

Prin metoda descrisă a fost dozată activitatea dehidrogenazelor izocitrică, lactică și succinică la nivelul ficatului. Din rezultate reiese că zonele periferice și centrale ale lobului hepatic conțin cantități egale de lactico-dehidrogenază, în timp ce succin-dehidrogenaza are o activitate de 1,6× mai mare periportal. În altă serie de experiențe, Nolte și Pette (394) au urmărit activitatea unor enzime cheie din metabolismul țesutului muscular : triozofostat-dehidrogenaza (glicoliza), dehidrogenaza lactică

Scanned with OKEN Scanner

(fermentația lactică) și dehidrogenaza succinică (ciclul acidului citric). Cercetările au fost întreprinse pe fibre musculare izolate, albe, roșii și intermediare din dreptul femural și solear de la șobolan. Rezultatele indică în fibrele albe un conținut ridicat în triozofosfat-dehidrogenază și lactat-dehidrogenază, dar mai scăzut în succin-dehidrogenază. Fibrele roșii au un conținut bogat în succin-dehidrogenază și relativ scăzut în triozofosfat-dehidrogenază și lactico-dehidrogenază. Fibrele intermediare au un conținut mediu în succin-dehidrogenază și activități relativ reduse de triozofosfat-dehidrogenază și lactat-dehidrogenază. Hormonul tiroidian induce creșterea activității succin-dehidrogenazei.

Scanned with OKEN Scanner

# 9. Noţiuni de stereologie

Metodele cantitative utilizate de mult în geologie şi metalurgie (123), (203), (247) au fost aplicate relativ recent şi în unele cercetări de citologie (158), (232), (330), (558).

Structura internă a unui organ poate fi investigată numai *după distrugerea* ţesuturilor. Cea mai frecvent utilizată metodă de *distrugere ordonată* este secţionarea ţesuturilor fixate şi incluzionate. Prin secţionare, integritatea ţesuturilor se păstrează în două din cele trei dimensiuni, în timp ce la a treia dimensiune se renunţă în folosul rezoluţiei. Unei secţiuni histologice i se pot recunoaşte trei caracteristici (554), (555) : 1) fiecare structură din ţesut este secţionată la întîmplare ; 2) unei structuri cu n dimensiuni în ţesut îi corespunde în secţiune o imagine cu n—1 dimensiuni : corpurile apar ca suprafeţe, suprafeţele ca linii şi liniile ca puncte ; 3) cantitatea de imagini din secţiune corespunde cantităţii de structuri din ţesutul secţionat. După Delesse (123) fracţiunea planimetrică a unei secţiuni ocupată de secţiunile dintr-un anumit compus corespunde fracţiunii volumului tisular ocupată de compusul respectiv.

Aplicarea metodelor stereologice depinde de anumite condiţii: obiectele care formează o structură trebuie să fie în număr mare, deoarece sînt utilizate procedee statistice ; distribuţia obiectelor trebuie să fie omogenă ; structura trebuie să fie izotropică, adică să nu existe orientare preferenţială (556).

În stereologie se foloseşte un sistem de notaţii recomandat de Societatea Internaţională de stereologie, pe care îl redăm în tabelul nr. 15.

## *Analiza volumetrică*
(fig. 18, a-c)

În 1847 Delesee (123) enunţa relaţia fundamentală a stereologiei, după care fracţiunea volumetrică ($V_{vi}$) a unui compus i din ţesut poate fi estimată prin măsurarea fracţiunii de suprafaţă ($A_{Ai}$) a unei secţiuni oarecare ocupată de transsecţiunile lui i :

$$V_{vi} = A_{Ai}. \qquad [1]$$

În practică, $A_{Ai}$ poate fi determinată prin planimetrie, metodă laborioasă şi puţin comodă. Rosiwal (454) găseşte că $A_{Ai}$ ar putea fi estimată prin integrare liniară, determinînd fracţiunea liniară $L_{Li}$ a liniilor test care trec prin transsecţiunile lui i. Mult mai tîrziu, în 1933, Glagoleff (203) observă că planimetria poate fi efectuată prin suprapunerea unei reţele de puncte pe secţiunea histologică şi numărarea punctelor de la transsecţiunile struc-

Scanned with OKEN Scanner

*Tabelul nr. 15*

**Notaţii folosite în stereologie**

| Gradientul de mărime a dimensiunilor investigate | Dimensiunea investigată | Prescurtarea utilizată |
|---|---|---|
| Dimensiuni individuale | volumul structurii i | $v_i$ |
| | suprafaţa structurii i | $s_i$ |
| | aria structurii i pe secţiune | $a_i$ |
| Dimensiuni colective ale unui grup de structuri | volumul colectiv al structurilor i | $V_i$ |
| | suprafaţa colectivă a structurilor i | $S_i$ |
| | aria colectivă a secţiunilor i | $A_i$ |
| | numărul structurilor i | $N_i$ |
| | lungimea colectivă a interceptărilor liniei test în i | $L_i$ |
| | numărul colectiv al punctelor test situate în i | $P_i$ |
| Dimensiuni relative | fracţiunea de volum ocupată de i (densitatea volumetrică) | $V_{vi}$ |
| | suprafaţa colectivă per volum (densitatea de suprafaţă) | $S_{vi}$ |
| | numărul structurilor i per volum (densitatea numerică) | $N_{vi}$ |
| | fracţiunea secţiunii ocupată de i | $A_{Ai}$ |
| | numărul transsecţiunilor lui i pe aria de secţiune | $N_{Ai}$ |
| | fracţiunea liniei test interceptînd pe i | $L_{Li}$ |
| | numărul intersecţiunilor cu i per lungimea liniei test | $N_{Li}$ |
| | fracţiunea punctelor test cuprinse în i | $P_{Pi}$ |
| Sisteme test | volumul test | $V_T$ |
| | secţiunea ariei test | $A_T$ |
| | lungimea liniei test | $L_T$ |
| | numărul punctelor test | $P_T$ |

turilor. Fracţiunea $P_{Pi}$ de puncte aflate la transsecţiunile lui i ar fi echivalentul lui $V_{vi}$:

$$V_{vi} = P_{Pi}. \qquad [2]$$

Acest procedeu este utilizat în special în microscopia electronică. Practic putem determina volumele relative ale nucleilor ($V_{Vn}$), mitocondriilor ($V_{Vm}$) lizozomilor ($V_{vl}$) şi citoplasmei ($V_{Vv}$) plasînd la întîmplare o reţea cu puncte regulate pe secţiuni variate. Informaţia dorită se obţine prin numărarea diferenţială a punctelor $P_i$ situate pe n, m, l şi c. Punctele dispuse pe alte structuri (interstiţiu etc.) sînt incluse într-un compartiment x. Se calculează numărul total de puncte test ca:

$$P_T = T_n + P_m + P_l + P_c P_x + = \Sigma P_i \qquad [3]$$

şi fracţiunile compuşilor ca:

$$V_{Vn} = \frac{P_n}{P_T},$$

$$V_{Vm} = \frac{P_m}{P_T},$$

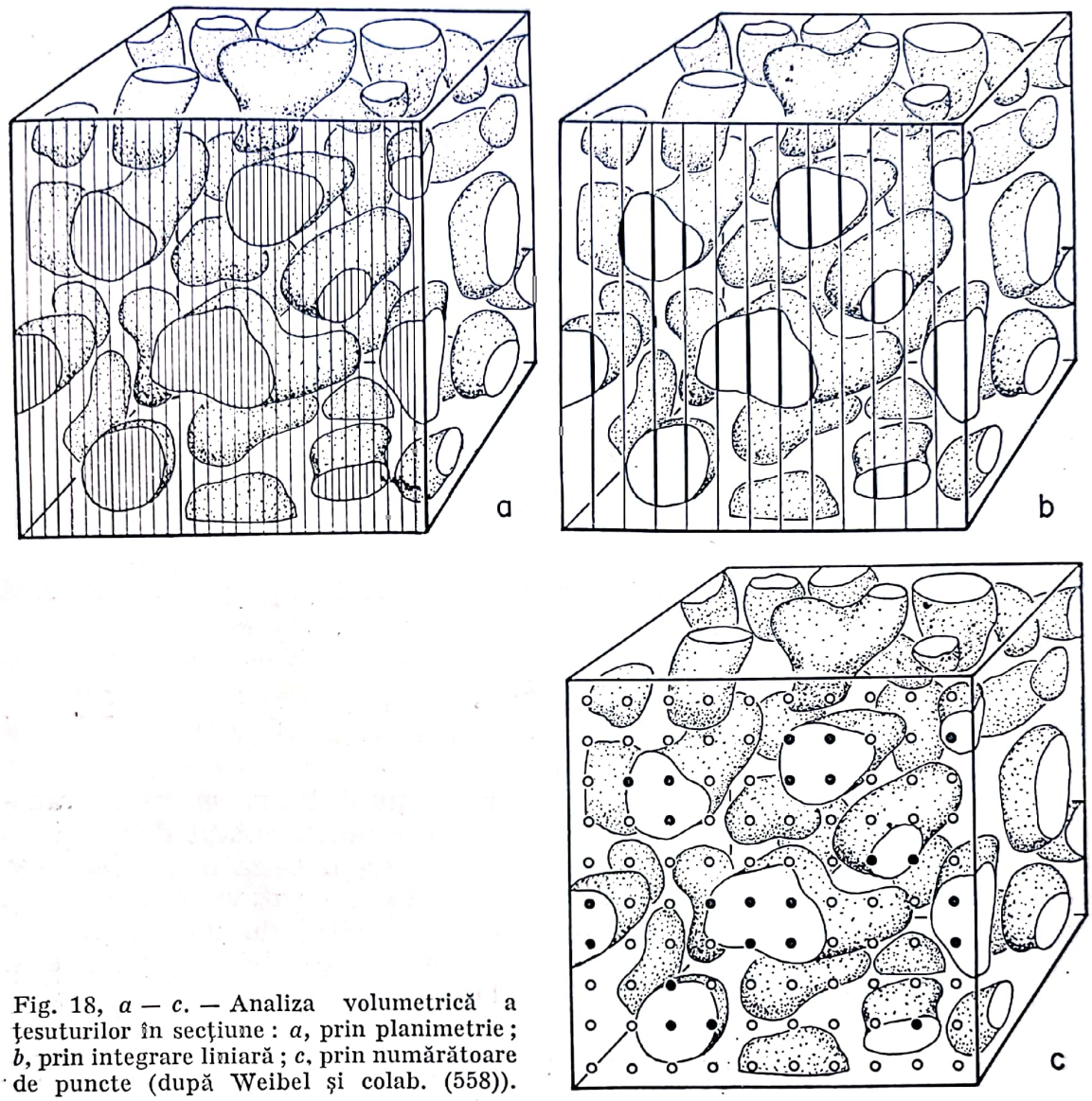



Fig. 18, *a — c.* — Analiza volumetrică a țesuturilor în secțiune : *a*, prin planimetrie ; *b*, prin integrare liniară ; *c*, prin numărătoare de puncte (după Weibel și colab. (558)).

în general ca :

$$V_{vi} = \frac{P_i}{P_T} = P_{Pi} \cdot \qquad [4]$$

Volumul absolut $V_i$ al unei anumite structuri, de exemplu mitocondriile, poate fi deci calculat, dacă se cunoaște volumul total al organului după formula :

$$V_i = V_{vi} \cdot V . \qquad [5]$$

## *Măsurarea suprafețelor*
(fig. 19)

În unitatea de volum, suprafețele de secțiune ale structurilor ocupa un anumit volum relativ sau densitate de volum ($V_{vi}$). Suprafața totală a

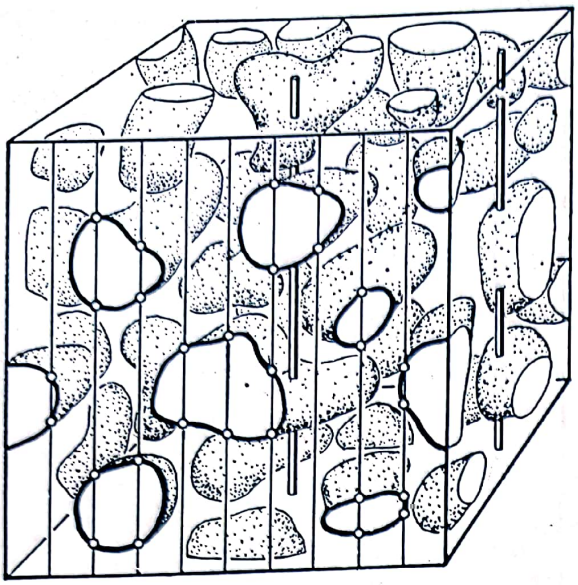


Fig. 19. — Determinarea densității suprafețelor prin numărul de intersecții ale suprafețelor cu probele liniare (după Weibel și colab. (558)).

structurilor ($S_i$), inclusă în unitatea de volum test ($V_T$), poate fi definită ca densitatea suprafețelor ($S_{vi}$) :

$$S_{vi} = \frac{S_i}{V_T} \cdot \qquad [6]$$

Suprafața acestor structuri apare pe secțiuni drept contur al transsecțiunilor. Lungimea contururilor pe unitatea de suprafață de secțiune este proporțională cu densitatea de suprafață ($S_{vi}$). Dacă o dreaptă test de lungime fixă ($L_T$) este plasată la întîmplare în țesut va străbate prin suprafața structurilor, de unde rezultă că numărul de intersecții ($N_i$) între dreapta test și suprafață va fi proporțional cu $S_{vi}$ și cu $L_T$. Tomkeieff (537) și Hennig (246) au dedus independent relația :

$$S_{vi} = \frac{2N_i}{L_T} = 2 \cdot N_{Li} \cdot \qquad [7]$$

Dat fiind că densitatea suprafeței ($S_{vi}$) este reprezentată pe secțiuni printr-o „densitate de contur" proporțională, dreapta test poate fi plasată la întîmplare pe secțiuni, iar $N_{Li}$ se poate obține prin simpla numărătoare a intersecțiunilor dintre probă și contururile suprafeței.

Suprafața totală a acestor structuri într-un volum dat se obține din :

$$S_{itot} = S_{vi} \cdot V \, . \qquad [8]$$

## *Raportul suprafață–volum (S/V)*
(fig. 20)

Corelat cu aspectul geometric al structurilor raportul S/V se dovedește foarte util și poate servi în aprecierea directă a unor proprietăți

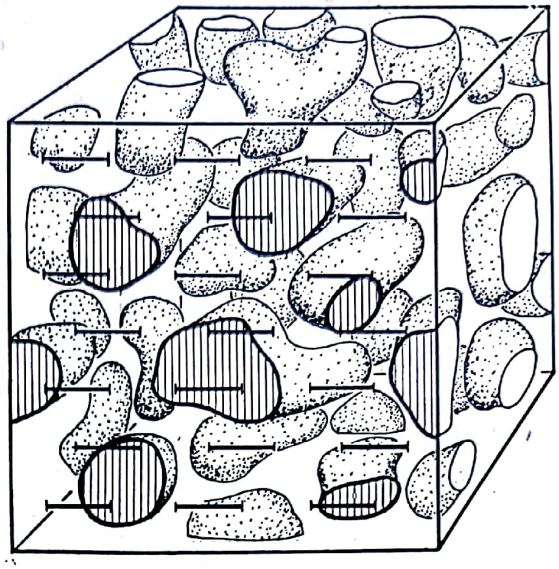


Fig. 20. — Estimarea raportului suprafață — volum prin proba liniilor scurte (după Weibel și colab. (558)).

fiziologice ale acestor structuri, deoarece cu ajutorul lui se determină mărimea ariei de contact per masa de structură.

Chalkley și colab. (81) au imaginat o metodă pentru evaluarea directă a raportului S/V. În acest scop este necesară combinarea calculului volumelor cu estimarea suprafeței prin intersectarea liniilor. Sistemul test constă din linii scurte de lungime egală Z plasate la întîmplare pe secțiuni. Cele două capete ale liniilor test sînt utilizate ca marker pentru volumetrie : punctele finale de pe secțiunile structurilor sînt numărate și notate cu $P_i$. Simultan și fără deplasarea sistemului test se numără intersecțiunile $N_{Zi}$ ale liniilor test, aflîndu-se astfel conturul suprafeței structurilor. Raportul si/vi al structurilor individuale i se obține prin :

$$\frac{si}{vi} = \frac{4 \cdot N_i}{Z \cdot P_i} \cdot \qquad [9]$$

## *Măsurarea grosimii medii*
(fig. 21)

După Weibel (556), grosimea medie a secțiunii $\bar{T}$ se definește ca volumul tisular mediu per jumătatea suprafeței secțiunii. Plasînd sistemul test de linii scurte de lungime Z pe secțiuni la întîmplare din stratul i se calculează numărul punctelor finale $P_i$, aflate pe stratul tisular, și numărul intersecțiunilor suprafeței $N_i$, obținînd :

$$\bar{T} = \frac{Z \cdot P_i}{2 \cdot N_i} \cdot \qquad [10]$$

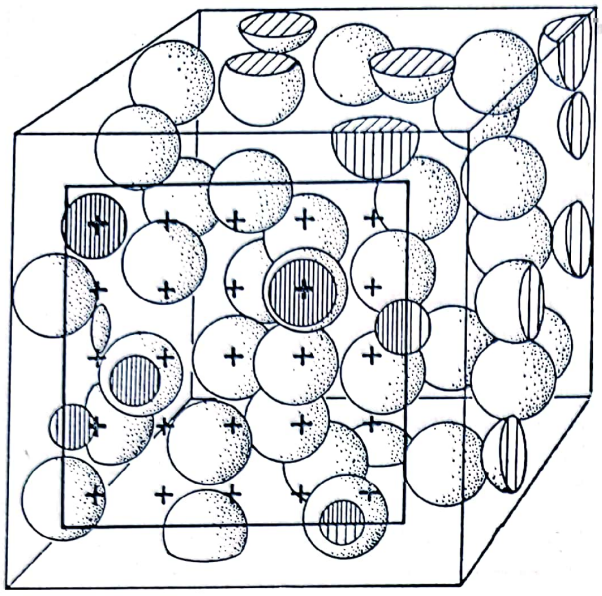


Fig. 21. —Estimarea numărului structurilor sferice după numărul secțiunilor și a densității volumetrice (după Weibel și colab. (558)).

## *Estimarea numărului de particule subcelulare*

Numărul $N_{vi}$ al structurilor subcelulare i, conținute în unitatea de volum, poate fi estimat ținînd seama că numărul transsecțiunilor lui, calculat pe unitatea de suprafață ($N_{Ai}$), este proporțional cu $N_{vi}$. Această relație depinde de forma și de distribuția de mărime a structurilor.

Dacă structurile au formă și mărime asemănătoare, relația între $N_{vi}$ și $N_{Ai}$ se exprimă prin formula lui de Hoff și Rhines (119) :

$$N_{Ai} = N_{vi} \cdot \overline{Di}, \qquad [11]$$

în care $\overline{D}$ este „diametrul tangent" mediu al structurilor.

Un alt principiu dezvoltat de Weibel și Gomez (557) necesită o estimare mai puțin exactă a formelor structurilor. În acest scop se utilizează formula :

$$N_{vi} = \frac{1}{\beta_i} \cdot \frac{N_{Ai}^{3/2}}{V_{vi}^{1/2}}, \qquad [12]$$

în care β reprezintă un coeficient de corecție a formelor.

$N_{Ai}$ și $V_{vi}$ pot fi determinate simultan, dacă se utilizează un sistem test în care o latice de puncte este inclusă într-o arie pătrată. Se calculează numărul de transsecțiuni $N_{Ai}$ aflate în interiorul pătratului și se determină fracțiunea de puncte $P_{Pi}$ după formula [4]. În ecuația [12] prin înlocuirea lui $P_{Pi}$ cu $V_{vi}$, se obține numărul de structuri din unitatea de volum. În cazul cînd mărimea structurilor variază în anumite limite trebuie introdus coeficientul de distribuție K (515) :

$$N_{vi} = \frac{1}{\beta_i} \cdot \frac{N_{Ai}^{3/2}}{V_{vi}^{1/2}} K. \qquad [13]$$

Scanned with OKEN Scanner

Din prezentarea sumară a principiilor de stereologie, rezultă că cercetările de morfometrie necesită o aparatură, constînd dintr-o *arie test* pentru numărarea structurilor, o latice de *puncte test* pentru calcularea volumelor și *linii test* pentru estimarea suprafețelor. Weibel și elevii săi utilizează un sistem test adaptabil pentru multiple scopuri.

În figura 22 *A*—*C* se prezintă aspectul general al sistemului test. O arie pătrată conține 21 de linii de lungime constantă Z dispuse în 7 șiruri echidistante și paralele. Rezultă o latice triunghiulară echilaterală avînd $P_T = 42$ de puncte terminale, care poate fi folosită ca puncte test pentru volumetrie. În acest aranjament fiecare punct de test are o valoare absolută a suprafeței a $= \frac{\sqrt{3}}{2} \cdot Z^2$; este posibilă planimetrarea cu acest sistem test atribuind fiecărui punct din aria planară de măsurat valoare ariei a.

Cele $1/2\ P_T = 21$ de drepte de lungime Z servesc la estimarea suprafeței, conform ecuației [7]. Notînd cu $N_L$ numărul intersecțiilor liniilor test cu conturul suprafețelor per cîmp test, lungimea totală a liniei test este :

$$L_T = 1/2\ P_T \cdot Z \cdot \qquad [14]$$

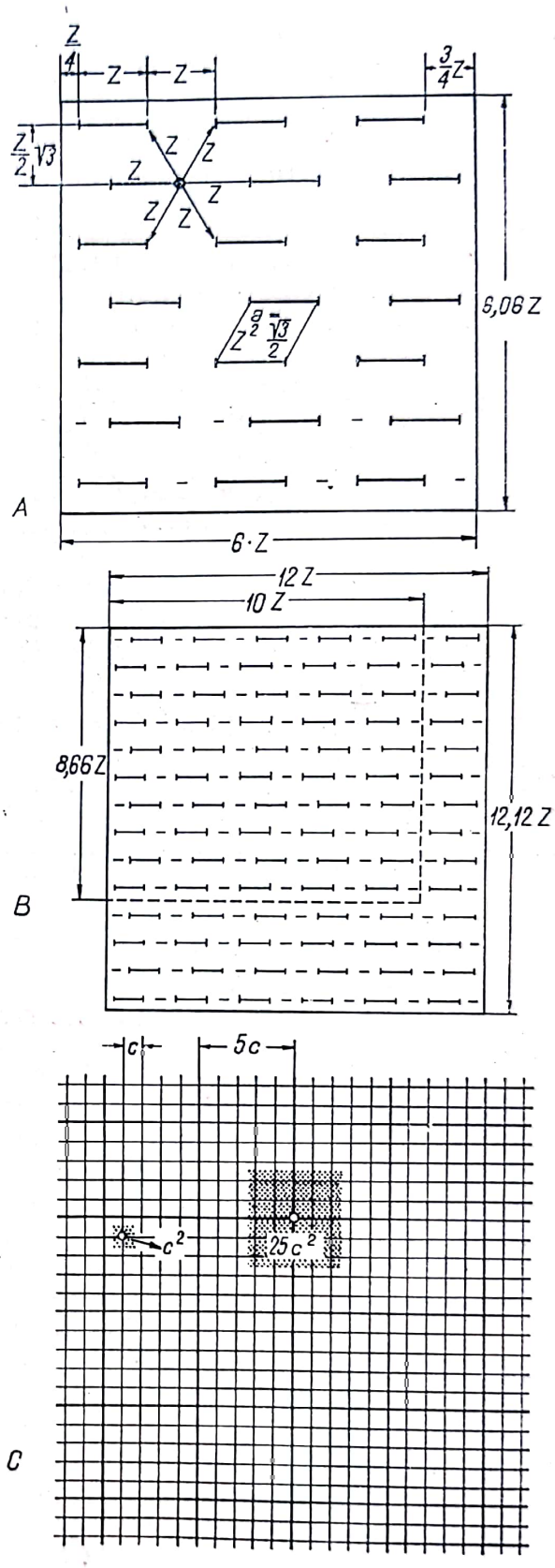



Fig. 22. *A* — *C*. — Sisteme stereologice test : *A*, sistem cu 21 de linii de lungime Z dispuse în rețea sub formă de triunghi echilateral ; *B*, sistem test cu 168 sau 100 de puncte ; *C*, latice pătrată conținînd o dublă latice cu perioada c și 5c utilizată în analiza volumetrică a particulelor rar diseminate (după Weibel și colab. (558)).

Sistemul test este inclus lntr-un cadru cu laturile măsurînd 6 Z; el cuprinde o suprafaţă care corespunde la aproximativ $P_T = 42$ de valori arie ale punctelor test. Dacă o latură a cadrului măsoară 6,06 Z, această relaţie este exactă.

Pentru morfometrie la microscopul electronic este necesar un aranjament mai dens al punctelor şi liniilor test.

În studiul densităţii volumetrice a structurilor lax răspîndite se poate utiliza un sistem de latice dublă, constînd dintr-o reţea pătrată. Volumul relativ ($V_s$) al structurilor s aflate în volumul citoplasmei ($V_c$) poate fi obţinut calculînd numărul $P_s$ al intersecţiunilor din s şi numărul $P_c$ al intersecţiunilor din citoplasmă, cu ajutorul formulei:

$$\frac{V}{V_c} = \frac{P}{2sP_s}. \qquad [15]$$

## *Aplicaţii ale stereologiei*

### Morfometrie pulmonară

În cercetări asupra structurilor care participă la schimburile gazoase din plămîn, Weibel (555) a urmărit suprafaţa dintre aer şi ţesut ($S_a$), dintre ţesut şi sîngele capilar ($S_c$), volumul sanguin capilar ($V_c$), volumul aerului ($V_a$), volumul tisular ($V_t$), grosimea medie a barierii dintre sînge şi aer ($\overline{T}$). În figura 23 se observă un cîmp pulmonar pe care se află suprapus sistemul de numărare test. Se notează localizarea punctelor terminale ale liniilor test situate în spaţiul de aer ($P_a$), ţesut ($P_t$) şi sînge ($P_c$), precum şi intersecţiile liniilor test cu suprafaţa alveolară ($N_{za}$) şi suprafaţa capilară ($N_{zc}$). Aşa cum rezultă din figura 23 din cele 168 de puncte test, 20 sînt situate pe ţesut şi 20 pe circuitul sanguin capilar, iar $N_{za} = 26$ şi $N_{zc} = 18$. Utilizînd aceste date se pot calcula cu ajutorul formulelor amintite volumele şi suprafeţele.

### Morfometrie hepatică

Folosind aceleaşi principii de stereologie, Weibel (556) a urmărit relaţiile spaţiale la nivelul ţesutului hepatic. Microscopul optic relevă că 96 % din volumul hepatic la şobolan este reprezentat de parenchimul lobular (hepatocite, sinusoide, spaţii Disse, capilare biliare). Restul de 4% include spaţiul port şi venele centrale. Teritoriul investigat la microscopul electronic cuprinde numai ţesut lobular. Din acesta 87 % este format din hepatocite, în timp ce sinusoidele, spaţiul perisinusoidal şi capilarele biliare însumează 13%.

Numărul nucleilor hepatocitari pe 1 ml de ţesut hepatic este de $169 \times 10^6$. Diametrul nuclear variază între 5 şi 11 $\mu$ cu o medie de $7{,}93 \pm 1{,}12$ $\mu$. Volumul nuclear mediu a fost estimat la 277 $\mu^3$, iar al hepatocitelor la 4 940 $\mu^3$. Diametrul hepatocitar mediu derivat din relaţia volum—suprafaţă este $17{,}7 \pm 0{,}8$ $\mu$.

Membrana hepatocitară este în contact cu trei compartimente diferite: spaţiul perisinusoidal, capilarele biliare, hepatocitele învecinate. Aproximativ 50% din suprafaţa hepatocitului este învecinată altor hepatocite, latura sinusoidală ocupînd 37%, iar peretele capilarului biliar 13%.

Scanned with OKEN Scanner

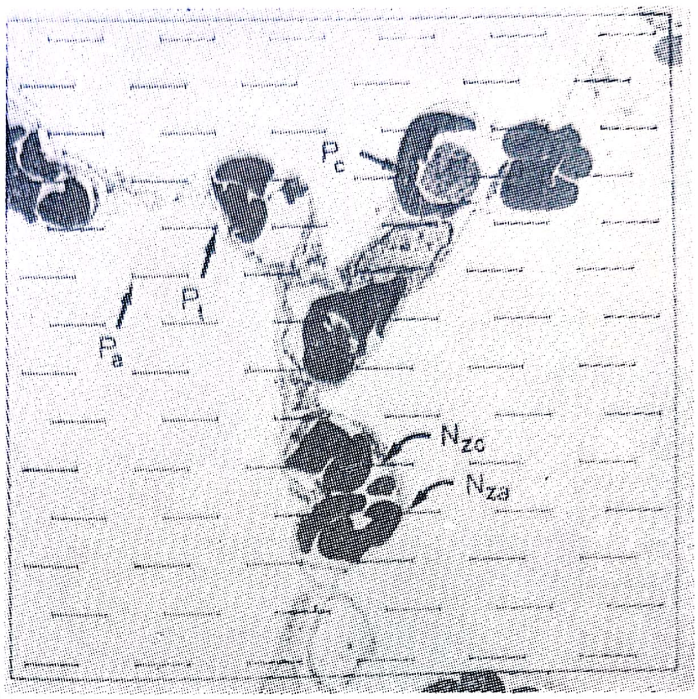



Fig. 23.— Secțiune prin plămîn pe care se suprapune sistemul test de analiză volumetrică. Localizarea punctelor finale ale liniilor test se face în spațiul aerian ($P_a$), tisular ($P_t$) și capilar ($P_c$). Intersecțiunile liniilor test cu suprafața alveolară ($N_{za}$) și capilară ($N_{zc}$) (după Weibel și colab. (558)).

Peste 50% din hepatocit este format din citoplasmă, nucleii ocupînd doar 6%. Spațiul mitocondriel reprezintă 22% (fig. 24 și 25), corpii denși și microbodies împreună 2%. Aproximativ 16% din citoplasmă este formată din cisternele reticulului endoplasmic (RE) (inclusiv aparatul Golgi) din care 2/3 apar în forma rugoasă. Densitatea volumetrică a cisternelor reticulului endoplasmic rugos este 0,10, în timp ce a reticulului neted este 0,061. Densitatea suprafeței medii a membranelor în citoplasmă este 8,1 și 6,0 $\mu^2/\mu^3$ pentru reticulul endoplasmic rugos și cel neted respectiv.

Raportul volum—suprafață (V/S) permite estimarea grosimii medii a cisternelor RE : pentru veziculele largi și turtite, ca în cazul cisternelor RE rugos, acesta măsoară semidistanța medie dintre membrane (V/S=d/2); dacă structura este tubulară, ca la RE neted, raportul V/S este jumătate din lungimea razei (V/S=d/4). Măsurătorile au indicat pentru reticulul rugos V/S = 131 Å, deci o grosime medie a cisternelor de 260 Å. Pentru reticulul neted V/S=107 Å. Diametrul tubilor este astfel în medie 430 Å. Suprafața totală a reticulului endoplasmic în volumul hepatic specific este de 37 $m^2$, din care 21 $m^2$ aparțin membranelor rugoase, iar 16 $m^2$ sînt membrane netede. Hepatocitul mononuclear conține 63 000 $\mu^2$ de membrane reticulo-endoplasmice, la care sînt atașați 12,7 milioane ribozomi.

Suprafața mitocondrială este de 1,5 $m^2$ în unitatea de volum hepatic. Membrana internă cu criste este de 6 $m^2$. Hepatocitul conține 1 665 de mitocondrii în medie, cu un volum total de 1 070 $\mu^3$, corespunzînd la 22% din volumul hepatocitului. Volumul mediu mitocondrial este estimat la 0,65 $\mu^3$. Avînd o formă cilindrică cu un diametru mediu de 0,6 $\mu$, lungimea medie a mitocondriei este de 2,4 $\mu$. Raportul S/V al unei mitocondrii este de 7,5 $\mu^{-1}$, ceea ce corespunde valorii de 8,1 $\mu^{-1}$, reprezentată de raportul S/V dintre învelișul și volumul întregului sistem mitocondrial.

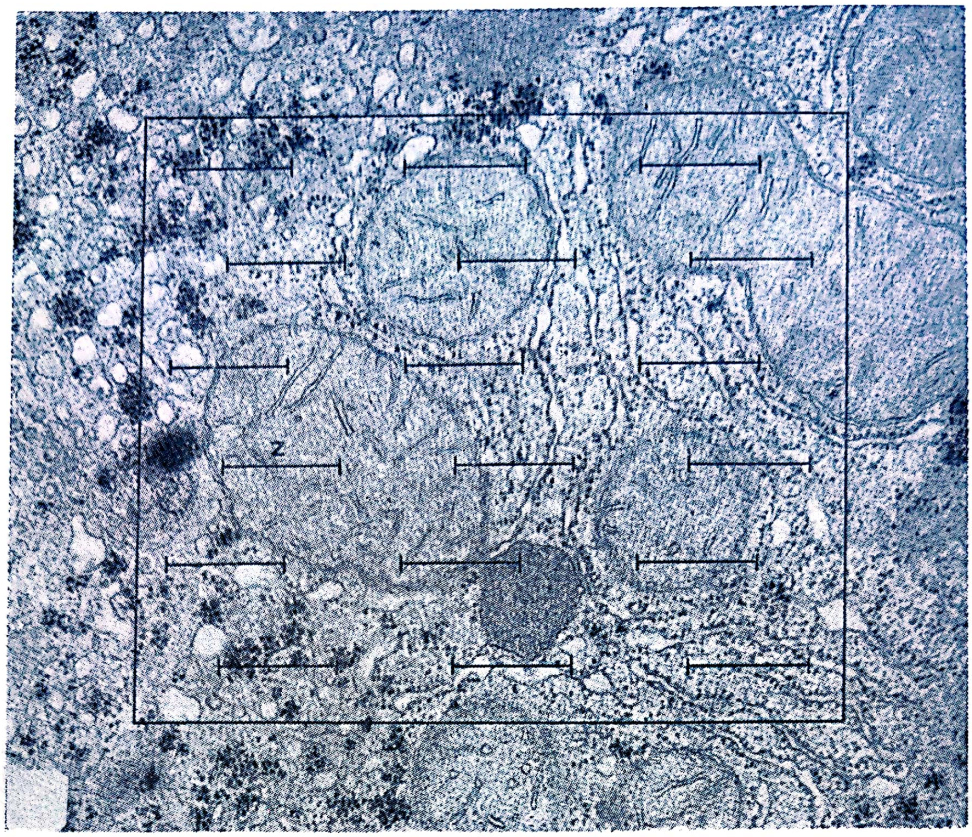



Fig. 24. — Rețea cu linii de lungime Z suprapusă mitocondriilor dintr-un hepatocit (după Weibel și colab. (558)).

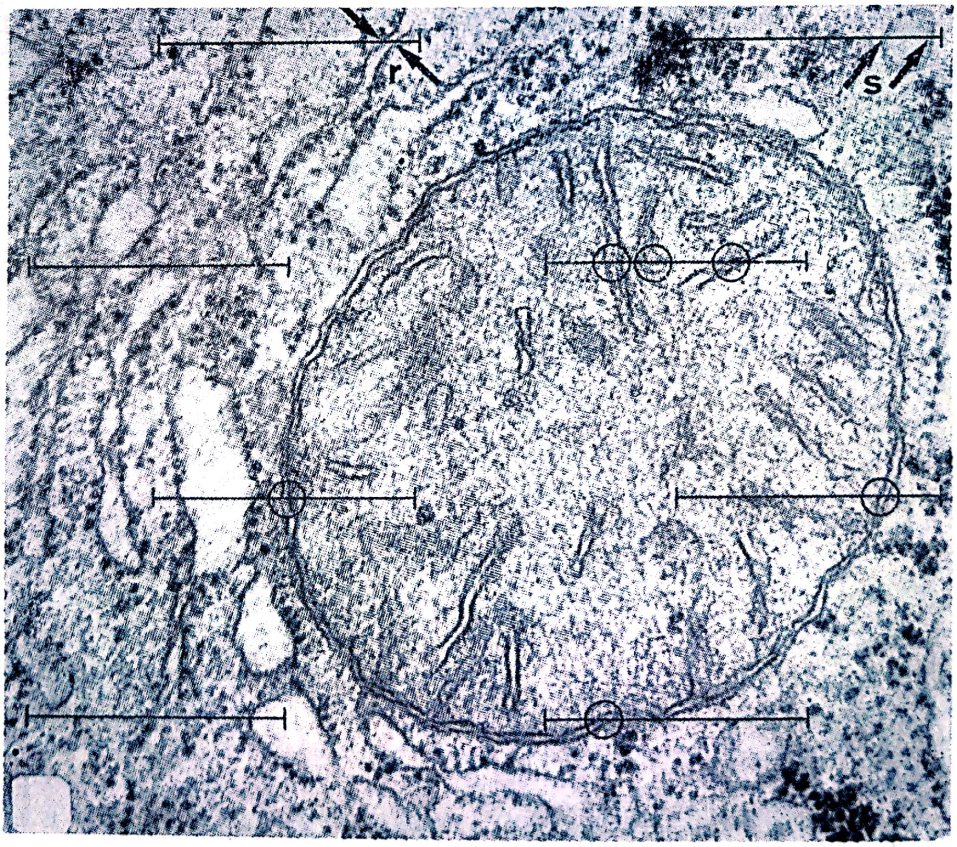



Fig. 25. — Microfotografie electronică pentru determinarea volumului mitocondriilor și reticulului endoplasmic. Săgețile indică intersecțiunile liniilor test cu membranele reticulului endoplasmic rugos (*r*) și neted (*s*) (după Weibel și colab. (558)).

Scanned with OKEN Scanner

# 10. Principii de autohistoradiografie cantitativă

Autoradiografia utilizează acţiunea fotografică a radiaţiilor ionizante pentru detecţia substanţelor radioactive. Izotopul este încorporat în căile metabolice ale sistemului biologic în acelaşi mod ca şi compusul similar, lipsit de suport radioactiv. Cantificarea în autoradiografie poate fi relativă sau absolută. Cantificarea relativă se bazează pe corespondenţa dintre cantitatea de radioactivitate din structurile morfologice şi numărul de granulaţii de argint pe care le-a produs. Cantificarea absolută, rareori folosită, utilizează numărul de granulaţii de argint în scopul calculării numărului exact al compuşilor izotopici prezenţi în structura morfologică. Acest tip de cantificare necesită o serie de standarde cu diluţii izotopice cunoscute şi răspunsul fotografic al emulsiei la izotopii folosiţi. Pentru majoritatea cercetărilor, cantificarea relativă a datelor este suficientă spre a stabili diferenţe în activitatea biologică pe baze comparative, în condiţii standard.

Există două procedee de a obţine măsurători relative de radioactivitate: 1) numărătoarea vizuală şi 2) densitometria. În numărătoarea vizuală se estimează numărul granulelor de argint produse de descompunerea izotopilor cu energie joasă. Izotopii cu energie înaltă, ca $^{14}C$ şi $^{32}P$, produc trasee cu granulaţii de argint. În acest procedeu intervin factori subiectivi, care atrag variaţii numerice destul de importante.

În încercările de a automatiza numărătoarea granulelor s-a folosit aparatura fotometrică. Dudley şi Pelc (145) au utilizat un microscop cu spot deplasabil. Mazia şi colab. (363) au folosit un microdensitometru, iar Tolles (536) a combinat un citoanalizator cu un „scanner" de piste nucleare. O încercare promiţătoare este determinarea fotometrică a luminii reflectate de către granulele de argint supuse iluminării în cîmp întunecat. Particulele de argint foarte mici reflectă însă cantităţi inegale de lumină şi împiedică acurateţea măsurătorilor. Un alt obstacol în numărarea automată este necesitatea de a avea la dispoziţie arii mari, de $10^4\mu^2$, dat fiind faptul că studiul celulelor izolate nu poate fi efectuat prin procedee automate.

## Estimarea cantitativă a autohistoradiografiilor

În estimarea cantitativă a granulelor de argint este necesară corectarea fondului. Aceasta se efectuează prin numărarea granulelor care acoperă lama în jurul zonelor investigate şi scăderea numărului lor din cantitatea totală de granulaţii situate deasupra ţesutului examinat.

Scanned with OKEN Scanner

Cele mai obişnuite cauze care duc la apariţia fondului sînt :

1. Prezenţa substanţelor chimice contaminante în emulsie. Sursele comune de contaminare sînt ionii metalici proveniţi din apa impură sau din aparatura metalică.

2. Radiaţiile din mediul înconjurător : raze cosmice, aparatură cu raze X, izotopi cu energii înalte în vecinătatea containerului cu emulsie, eventuala prezenţă a urmelor de material radioactiv în gelatina sau în lama microscopică.

În scopul îndepărtării radiaţiei de fond s-a propus utilizarea $H_2O_2$ care scade fondul cu 95% fără a afecta sensibilitatea emulsiei. Un alt procedeu este menţinerea autoradiografiilor în timpul expunerii la —70°C.

Densitatea granulaţiilor poate fi raportată la nucleu, celulă sau la unitatea de suprafaţă tisulară.

Tehnica de autoradiografie este relativ simplă şi poate fi efectuată uşor în laboratoarele de rutină. Pot apărea însă o serie de variabile care influenţează rezultatele la fiecare din etapele tehnicii : 1) administrarea şi încorporarea izotopului (cantitatea administrată, metoda de administrare, irigaţia ţesutului marcat, căile metabolice ale izotopului folosit, efectul temperaturii, pH-ului, hormonilor) ; 2) pregătirea histologică a probelor ; 3) aplicarea emulsiei autoradiografice ; 4) condiţiile de păstrare ale autoradiografiilor în timpul expunerii ; 5) factorii fizici care afectează densitatea autoradiografiilor : colorarea, fondul, grosimea şi mărimea secţiunii, densitatea celulară, grosimea şi sensibilitatea emulsiei, spectrul de energie al izotopului.

Variabilele biologice ale experienţelor autoradiografice sînt mai greu de controlat. Peterson şi Baserga (419) au constatat că modul de administrare influenţează cantitatea de izotop încorporată de diferitele ţesuturi. Majoritatea izotopilor sînt imediat preluaţi de ţesuturi din sistemul circulator : $^3$H-timidina trece din sînge în ADN-ul din celulele măduvei hematogene în 15 s de la injecţie, iar după ce a circulat de două ori prin sînge, nivelul $^3$H-timidinei scade la 50% (173). În cursul dezvoltării embrionare, $^3$H-leucina din circulaţie are o semiperioadă de 20 min. Borsook şi colab. (54) au observat un clearance de 97% a aminoacizilor marcaţi cu $^{14}$C în sîngele şobolanilor la 10 min după injecţie. Vascularizaţia şi hemodinamica unui anumit ţesut joacă un rol esenţial în încorporarea izotopilor radioactivi. Celulele situate imediat lîngă capilare încorporează cele dintîi izotopul, dar, datorită schimburilor rapide cu elementele din jur, se ajunge la o distribuţie practic egală a precursorilor marcaţi.

Factorii care afectează localizarea radiografică şi rezoluţia sînt grosimea secţiunii, mărimea granulelor developate şi dimensiunile cristalelor de argint.

Autoradiografia la microscopul electronic necesită o conservare excelentă atît a morfologiei tisulare, cît şi a izotopului administrat. Cei mai buni fixatori s-au dovedit glutaraldehida, eficientă şi în citoenzimologie, şi tetraoxidul de osmiu.

În autoradiografia la microscopul electronic este de dorit să se îndepărteze stratul de gelatină pentru a se mări rezoluţia şi vizualizarea structurilor celulare fine. În acest scop s-au propus diferite metode, ca digestia cu tripsină, alcalii sau acizi sau dizolvarea cu apă fierbinte ; toate prezintă însă riscul deplasării şi pierderii granulelor de argint.

Scanned with OKEN Scanner

## Aplicații ale autohistoradiografiei cantitative

*Localizarea ADN.* Posibilitățile autoradiografiei au fost considerabil extinse prin aplicarea acestei tehnici în microscopia electronică. Cercetările lui Millner și Hayhoe (380) pe limfocite, precum și ale lui Blondel (48) pe celule KB confirmă că ADN este sintetizat numai în zona necondensată, eucromatică a nucleului. Posibilitatea inițierii sintezei ADN la nivelul membranei nucleare a fost investigată de Comings și Kakefuda (93), ca și de Jacob (282). Prezența ADN intranucleolar a fost clar demonstrată de N și P. Granboulan (213) și mai recent de Charret și Andre (83). Cercetările de autohistoradiografie la microscopul electronic au relevat existența ADN în mitocondrii (12), (83).

Urmărind efectul unor hormoni asupra încorporării $^{3}$H-timidinei în culturi de pineală (533), am observat că tiroxina stimulează încorporarea $^{3}$H-timidinei în ADN, în timp ce cortizolul, testosteronul și stilbestrolul diminuează numărul nucleilor marcați. Hormonul de creștere nu are efect semnificativ asupra încorporării de timidină. Indicele mitotic este stimulat de tiroxină (tabelul nr. 16).

*Tabelul nr. 16*

**Indicele de marcare și indicele mitotic în pinealocitele cultivate *in vitro* sub influențe hormonale**

| Pinealocite cultivate | Indice de marcare % | Indice mitotic % |
|---|---|---|
| Culturi de pineală martor | 7,96 | 0,19 |
| Culturi de pineală + h. somatotrop (10 μg/ml mediu) | 9,03 | 0,73 |
| Culturi de pineală + h.somatotrop (100 μg/ml mediu) | 7,12 | 0,43 |
| Culturi de pineală + tiroxină (5 μg/ml mediu) | 11,64 | 1,08 |
| Culturi de pineală + tiroxină (25 μg/ml mediu) | 13,02 | 1,18 |
| Culturi de pineală + tiroxină (50 μg/ml mediu) | 20,66 | 1,57 |
| Culturi de pineală + cortizol (5 μg/ml mediu) | 3,10 | 0,08 |
| Culturi de pineală + cortizol (25 μg/ml mediu) | 2,14 | 0,14 |
| Culturi de pineală + cortizol (200 μg/ml mediu) | 1,21 | 0,04 |
| Culturi de pineală + testosteron (1 μg/ml mediu) | 8,87 | 0,34 |
| Culturi de pineală + testosteron (10 μg/ml mediu) | 2,60 | 0,37 |
| Culturi de pineală + testosteron (20 μg/ml mediu) | 3,94 | 0,04 |
| Culturi de pineală + stilbestrol (0,1 μg/ml mediu) | 3,24 | 0,19 |
| Culturi de pineală + stilbestrol (1 μg/ml mediu) | 4,22 | 0,09 |
| Culturi de pineală + stilbestrol (10 μg/ml mediu) | 1,54 | 0,05 |

*Localizarea ARN.* Sinteza ARN a fost amplu studiată în nucleol. S-a demonstrat astfel că ARN se formează în aria fibroasă și apoi este transportat în zona granulară a nucleolului (195), (213). Sediul sintezei ARN în mitocondrii a fost investigat de Gibbs (202), Curgy (110), Nagata (389).

*Localizarea proteinelor și carbohidraților.* Lucrările devenite clasice ale lui Caro și Palade (73) au confirmat cu pertinență că proteinele nousintetizate în pancreas se deplasează din reticulul endoplasmic spre

Scanned with OKEN Scanner

zona Golgi, apoi în granulele de zimogen şi, în sfîrşit, în lumenul acinilor. Rolul complexului Golgi în concentrarea proteinelor a fost urmărit şi în mamelă (559), adenohipofiză (434), mielocite (172), ficat (18), ganglionii spinali (143), insulele Langerhans (278), tiroidă (388). Ross şi Benditt (455) au obţinut date privind concentrarea marcajului în ariile ocupate de reticulul endoplasmic, complexul Golgi, colagenul extracelular la diferite perioade după administrarea aminoacidului marcat. Jamieson şi Palade (290) au definit cu claritate rolul veziculelor mici din zona Golgi în transportul intracelular al proteinelor. Sediul sintezei şi mecanismul de secreţie al anticorpilor au fost examinate de Clark (89).

Autoradiografia a adus contribuţii importante la elucidarea rolului aparatului Golgi în sinteza carbohidraţilor (143), (448).

*Localizarea lipidelor.* O. şi J. Stein (507) localizează sediul esterificării glicerolului şi studiază transportul intracelular al lipidelor esterificate. Aceiaşi autori urmăresc sinteza, transportul şi secreţia grăsimilor neutre în ficat şi în mamelă. Se presupune participarea activă a aparatului Golgi în secreţia de lipoproteine în ficat. Procesul formării de mielină, folosind colină marcată, a fost urmărit de Hendelman şi Bunge (245). Localizarea intranucleară a lipidelor cu $^{3}$H-glicerol a fost investigată de Rose şi Frenster (451).

*Localizarea hormonilor.* Încercările de a stabili sediul hormonilor încep cu studiile privind localizarea radioiodului şi mai tîrziu a hormonilor tiroidieni marcaţi cu iod. Nadler şi colab. (388) arată că, în timp ce componenta proteică a tireoglobulinei este sintetizată în celulele foliculare, iodarea proteinei are loc în lumenul folicular. Fujita şi Honma (185) admit că iodarea se produce atît intraluminal, cît şi intracitoplasmatic. Numeroase lucrări descriu localizarea autohistoradiografică a altor hormoni: estrona şi dezoxicorticosteronul (332), testosteronul, insulina (36), progesteronul (332), (447).

*Localizarea enzimelor.* Identificarea, sediul şi cantificarea enzimelor în celule izolate constituie o cerinţă esenţială a biologiei. Metodele se bazează fie pe procedee de disecţie, în care celulele izolate sau grupate sînt extrase din contextul lor, deci cu pierderea topografiei tisulare, fie pe tehnici *in situ* cu menţinerea intactă a populaţiei celulare. Deoarece cantificarea este extrem de dificil aplicabilă citochimiei clasice, au fost utilizate metode microspectrofotometrice, fluorimetrice sau interferometrice. O metodă modernă, utilizată în citoenzimologia cantitativă, este legarea de moleculele de enzimă a unui inhibitor izotopic marcat şi evidenţierea lui autoradiografică. Această tehnică presupune că inhibitorul marcat pătrunde în celule şi că există o relaţie stoichiometrică între inhibitor şi moleculele cu activitate enzimatică. Un exemplu este diizopropil-fosfofluoridatul (DFP), inhibitor al esterazelor. În forma marcată cu $^{3}$H, DFP a fost utilizat de Rogers (447) şi Salpeter (462) pentru evidenţierea autoradiografică a acetilcolinesterazei în plăcile terminale din muşchi (462), în megacariocite (112), în ficat şi în rinichi (405). Acelaşi inhibitor a fost folosit pentru evidenţierea proteazelor în mastocitele peritoneale (33), (112). Un alt inhibitor, $^{3}$H-ametopterina , a fost utilizat pentru evidenţierea tetrahidrofolat-reductazei (112). O utilizare largă are în ultimul timp $^{3}$H-diizopropilfosfofluoridatul în autohistoradiografia la microscopul electronic.

Scanned with OKEN Scanner

# 11. Microscopia cantitativă sistemică cito-histolgică

## Țesutul epitelial

*Epiteliul simplu.* Nucleii epiteliului simplu pavimentos sînt fie ovoizi, uneori cu o elongație de peste 5 și cu o axă mică în general foarte scurtă, fie rotunzi, cu elongația de 1—1,4. Epiteliul cilindric sau stratificat prezintă nuclei de obicei sferoizi cu o elongație de 1,47. În epiteliul cilindric stratificat nucleii din straturile profunde sînt mai mici și mai rotunzi.

Un rol important îl joacă orientarea secțiunilor; rezultatele cariometrice sînt exacte numai cînd deviațiile angulare între secțiuni nu depășesc 15°.

*Epiteliul stratificat.* Măsurătorile cariometrice trebuie efectuate separat pe fiecare strat în parte. Cînd epiteliul este studiat în totalitate, rezultatele pot fi cu totul variabile datorită diferitelor forme de nuclei întîlniți. Deviația standard a volumelor nucleare este în acest caz mare, iar curba rezultată apare turtită și neregulată. Sînt de preferat secțiunile în care se disting toate straturile.

Cercetările citofotometrice cu ajutorul UMSP I pe pielea umană la diferite grupe de vîrstă: nou-născuți și sugari (1 zi—5 luni), adulți (18—35 de ani) și senescenți (64—84 de ani) indică diferențe frapante atît în privința volumelor nucleare, cît și a cantității și concentrației de ADN (540). Măsurătorile nucleare și estimarea acizilor nucleici au fost efectuate atît pe nucleii stratului bazal, cît și pe ultimul rînd din stratul spinos. Pentru cantificarea acizilor nucleici s-a folosit colorația galocianin-cromalaun.

La nou-născuți și sugari epiderma constă din 4—5 straturi celulare (fig. 26). Nucleii stratului bazal au un volum mediu de 161 $\mu^3$; în stratul spinos se observă un volum mediu de 84 $\mu^3$, ceea ce înseamnă o reducere a volumului cu 47 %.

Conținutul în acizi nucleici este de $10 \times 10^{-12}$ g în stratul bazal și de $6 \times 10^{-12}$ g în stratul spinos, reprezentînd deci o scădere a conținutului cu 38 %, corelată cu scăderea volumului nuclear. Concentrația în acizi nucleici este de 7 % atît în stratul bazal, cît și în cel spinos.

La adulții între 18 și 35 de ani epiderma cuprinde 5—10 straturi celulare (fig. 27). Nucleii celulelor bazale au un volum de 155 $\mu^3$. În stratul spinos volumul se reduce la 96 $\mu^3$, deci o scădere de 37 %. Conținutul în acizi nucleici este în stratul bazal de $10 \times 10^{-12}$ g și de $6{,}6 \times 10^{-12}$ g în cel spinos, așadar o diferență de 33 % între straturi. Concentrația în acizi nucleici este de 7 % în ambele straturi cercetate.

Scanned with OKEN Scanner

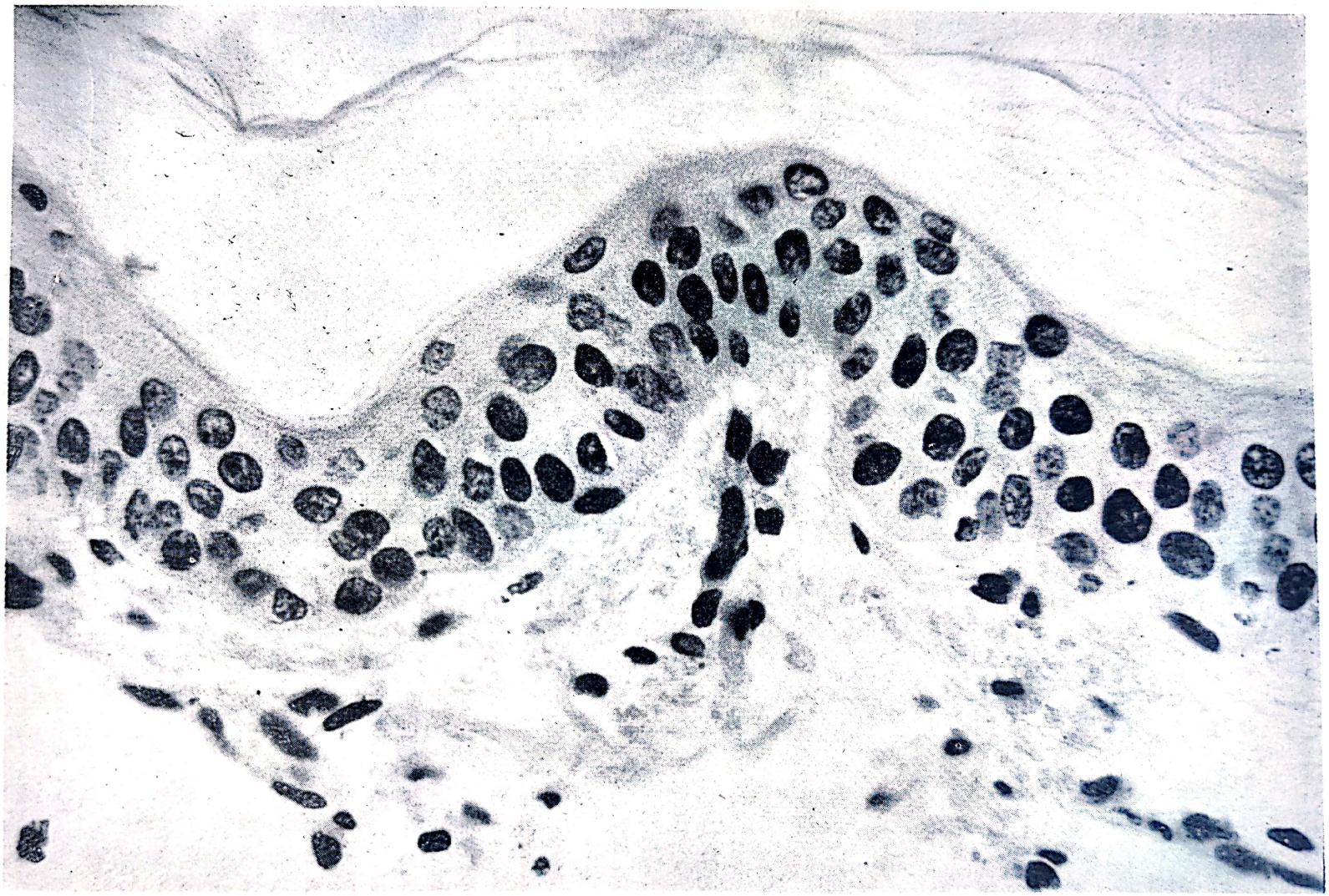


Fig. 26. — Secţiune prin tegumentul unui nou-născut de două zile. Epiteliul constă din 4—5 straturi (col. galocianin-cromalaun, × 585).

Scanned with OKEN Scanner

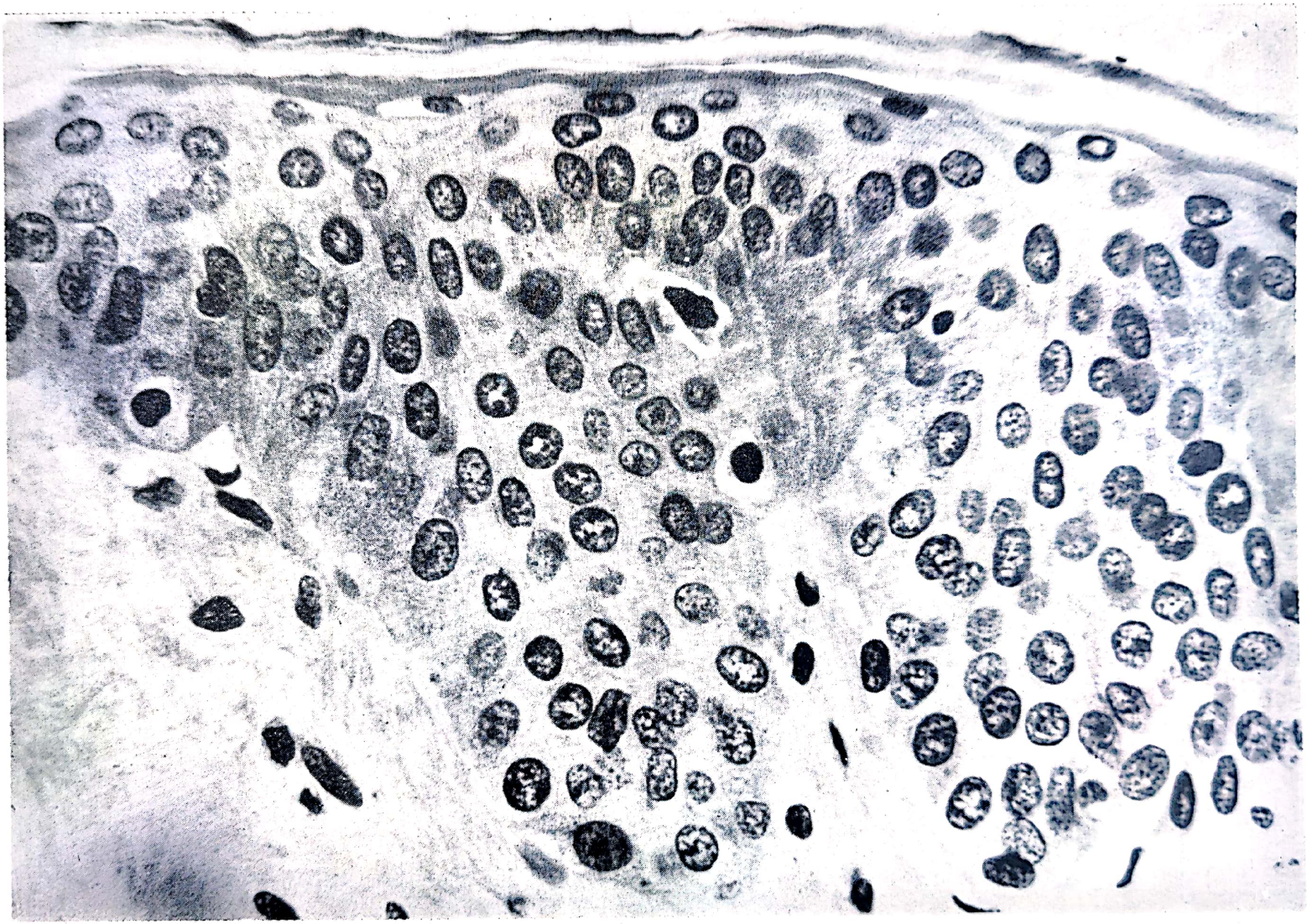


Fig. 27. — Secțiune prin pielea unui bărbat de 20 de ani. Epiderma formată din 5—10 straturi (col. galocianin-cromalaun, × 585).

La senescenţii între 64 şi 84 de ani se observă numai 4—5 şiruri celulare în epidermă (fig. 28). Volumul nuclear este de 89 $\mu^3$ în stratul bazal şi de 54 $\mu^3$ în cel spinos, deci o scădere de 39 %.

Conţinutul în acizi nucleici este de $6{,}2 \times 10^{-12}$ g în stratul bazal şi de $3{,}9 \times 10^{-12}$ g în stratul spinos. Reducerea reprezintă 37 %.

Concentraţia în acizi nucleici este de 7 %, avînd aceeaşi valoare ca şi la celelalte grupe de vîrstă examinate (tabelul nr. 17).

*Tabelul nr. 17*

**Valoarea medie a volumelor nucleare, cantităţii şi concentraţiei în acizi nucleici la trei grupe de vîrstă (după Tschahargane (540))**

| Grupe de vîrstă | Volum nuclear $\mu^3$ | | Cantitatea de acizi nucleici $10^{-12}$ g | | Concentraţia de acizi nucleici % | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | stratul | | stratul | | stratul | |
| | bazal | spinos | bazal | spinos | bazal | spinos |
| I. Sugari şi nou-născuţi | 161 | 84 | 9,9 | 6,0 | 6,3 | 7,3 |
| II. Adulţi | 155 | 96 | 9,9 | 6,6 | 6,6 | 7,0 |
| III. Senescenţi | 89 | 54 | 6,2 | 3,9 | 7,1 | 7,4 |

Comparînd rezultatele măsurătorilor, reiese că volumele nucleare la subiecţii din grupele de vîrsta I şi II sînt oarecum egale. Dimpotrivă, nucleii epidermici la oamenii în vîrstă prezintă o scădere cu aproximativ 40 %. Dealtfel retracţia nucleilor dincolo de 60 de ani apare şi în imaginile microfotografice.

Nucleii epidermali conţin aproximativ aceeaşi cantitate de acizi nucleici la copii şi la adulţi. La senescenţi se observă o diminuare a cantităţii de acizi nucleici cu circa 40 %. Remarcabil este faptul că la toate grupele de vîrstă concentraţia acizilor nucleici rămîne practic constantă (7 %).

Ca şi acizii nucleici totali, cantitatea de ADN are aceeaşi tendinţă de a diminua în funcţie de vîrstă. În stratul bazal se observă o cantitate de $8 \times 10^{-12}$ g, care scade la senescenţi cu aproximativ 30 %. În contrast, concentraţia ADN rămîne constantă în tot cursul vieţii, egală cu 6 %.

Histonele, colorate cu fast-green, se găsesc în aceeaşi cantitate de $7 \times 10^{-12}$ g la toate grupele de vîrstă. Concentraţia acestor substanţe este de 5 % atît la copii, cît şi la adulţi. La senescenţi concentraţia se dublează.

Histogramele pentru volumele nucleare indică o deplasare a maximelor spre stînga, de la stratul bazal spre cel spinos (fig. 29). Aceeaşi tendinţă se întîlneşte şi după vîrsta de 60 de ani, ceea ce atestă ideea că volumele nucleare scad puţin timp înainte de moartea lor fiziologică (fig. 30). Diagrama de frecvenţă a cantităţii de acizi nucleici pentru nucleii din stratul spinos este deplasată spre stînga în comparaţie cu nucleii stratului bazal (fig. 31 şi 32). Acelaşi aspect se constată şi la senescenţi în raport cu copiii şi tinerii.

Concentraţia acizilor nucleici este distribuită identic în toate grupele de vîrstă, atît în stratul bazal, cît şi în cel spinos, încît poate fi considerată ca o constantă biologică a organismului (fig. 33 şi 34).

Scanned with OKEN Scanner

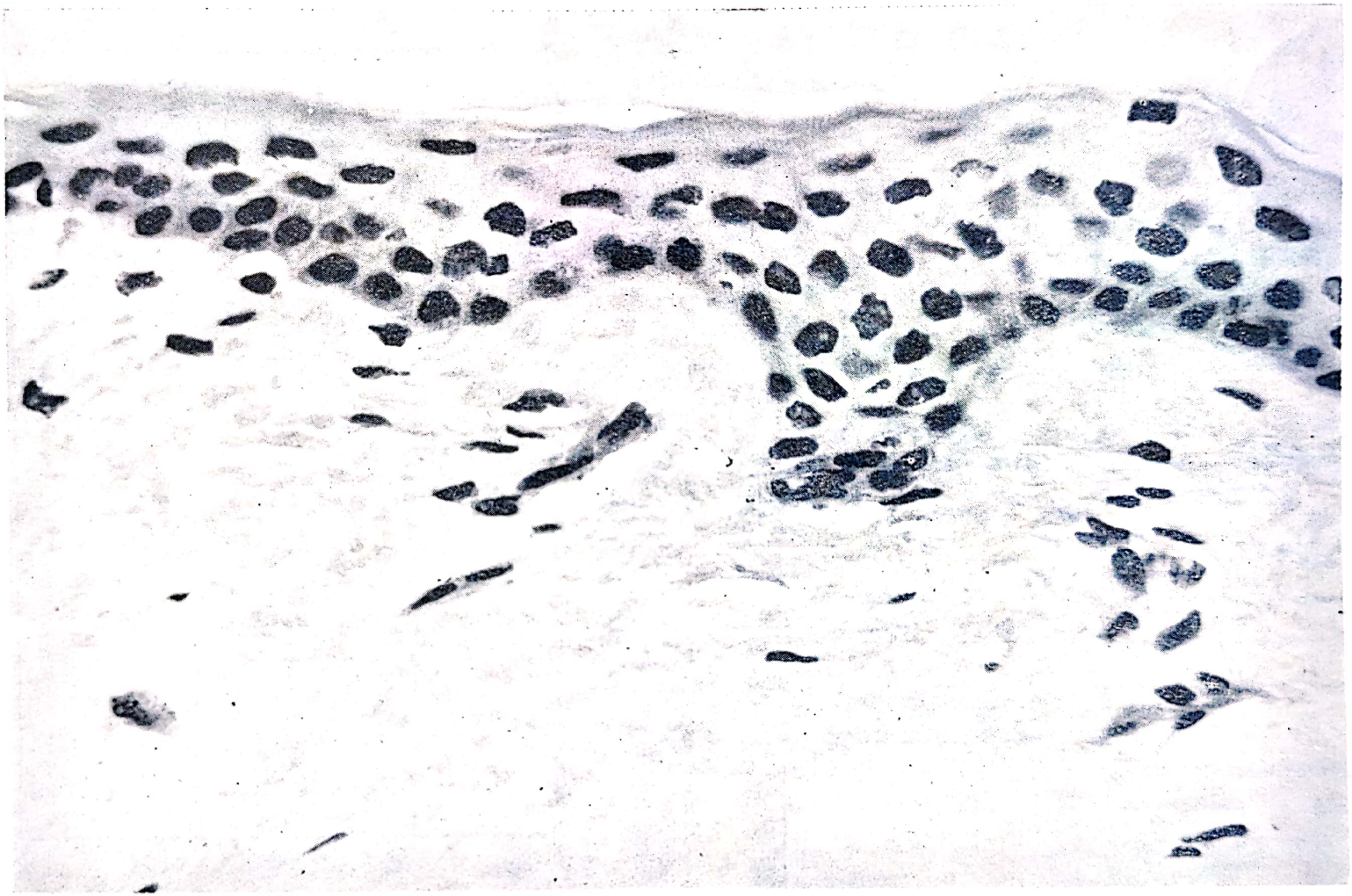


Fig. 28. — Secţiune prin tegumentul unui bărbat de 70 de ani. Reducerea grosimii epidermei şi diminuarea volumului nuclear (col. galocianin-cromalaun, × 585).



Scanned with OKEN Scanner

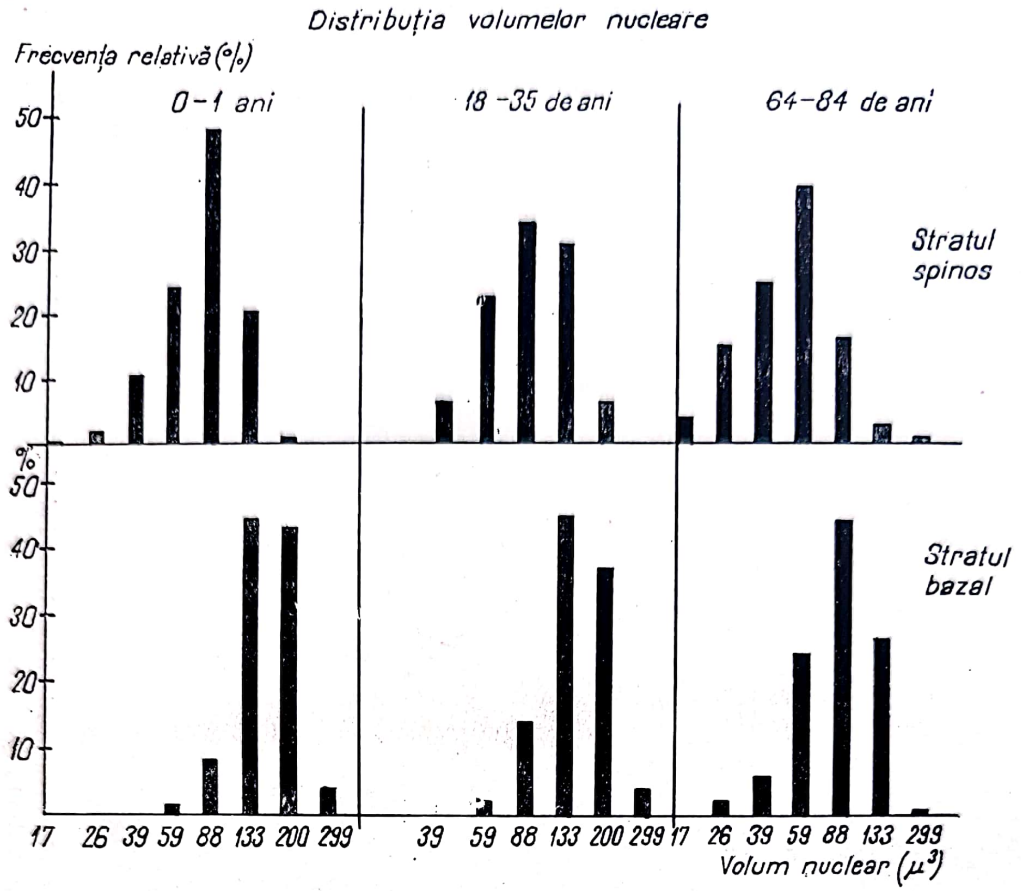



Fig. 29. — Histograma volumelor nucleare la 3 grupe de vîrstă : 0—1 an, 18—35 de ani, 64—84 de ani. Frecvența maximă a volumelor nucleare este deplasată de la dreapta spre stînga, pornind de la stratul bazal spre cel spinos. Aceeași deplasare se constată și în decursul vieții.

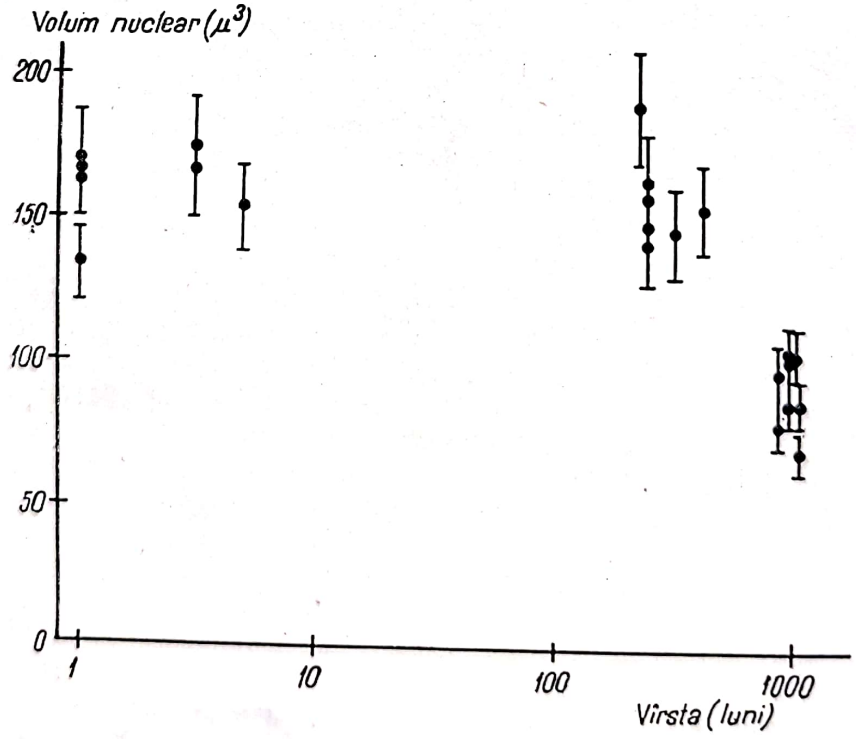



Fig. 30. — Interrelația volumelor nucleare medii din stratul bazal al epidermei în raport cu vîrsta. Vîrsta este reprezentată în scală logaritmică. Volumul nuclear scade după 60 de ani.

Scanned with OKEN Scanner

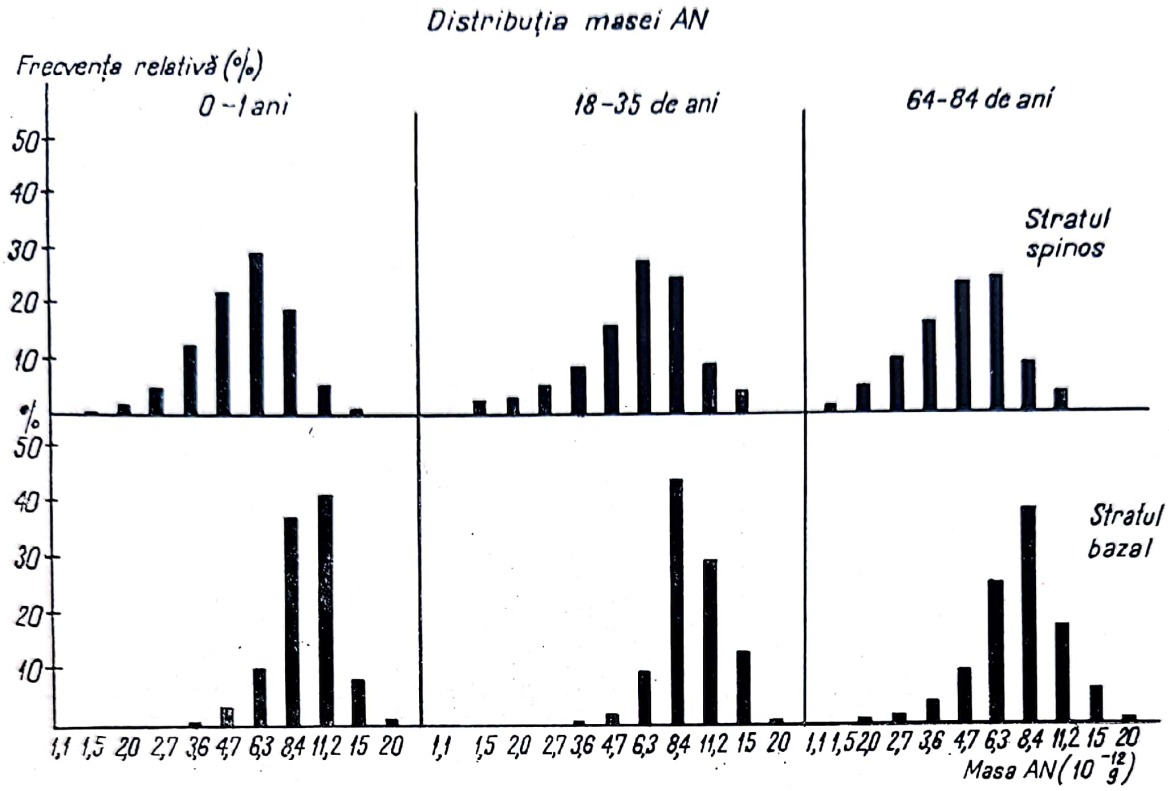



Fig. 31. — Histograma cantităţii de acizi nucleici în epiderma umană. Frecvenţa maximă este deplasată spre stînga din stratul bazal spre cel spinos. Aceeaşi levodeviere se constată şi în decursul vieţii.

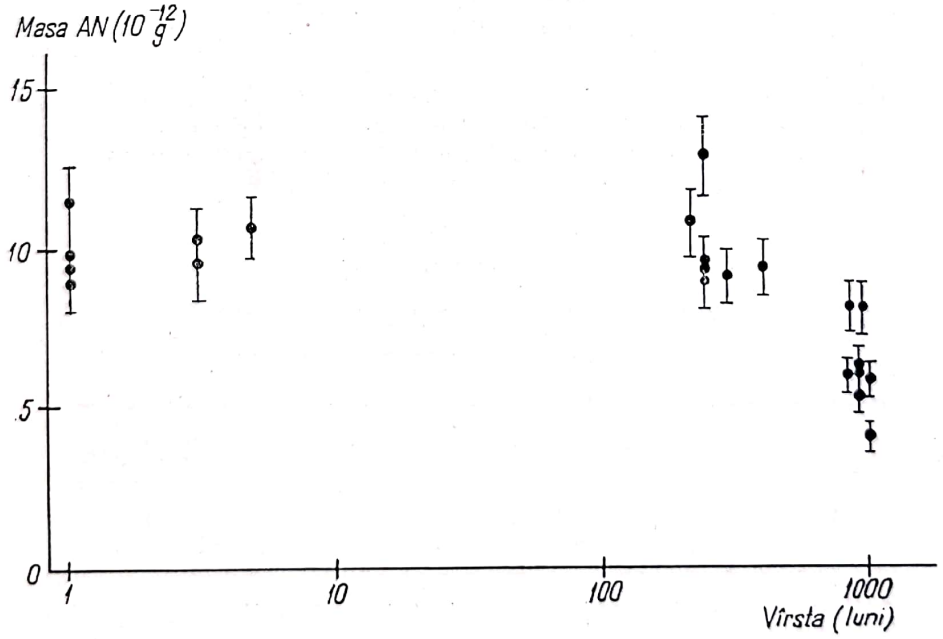



Fig. 32. — Scăderea cantităţii de acizi nucleici în epiderma umană concomitent cu vîrsta.

Scanned with OKEN Scanner

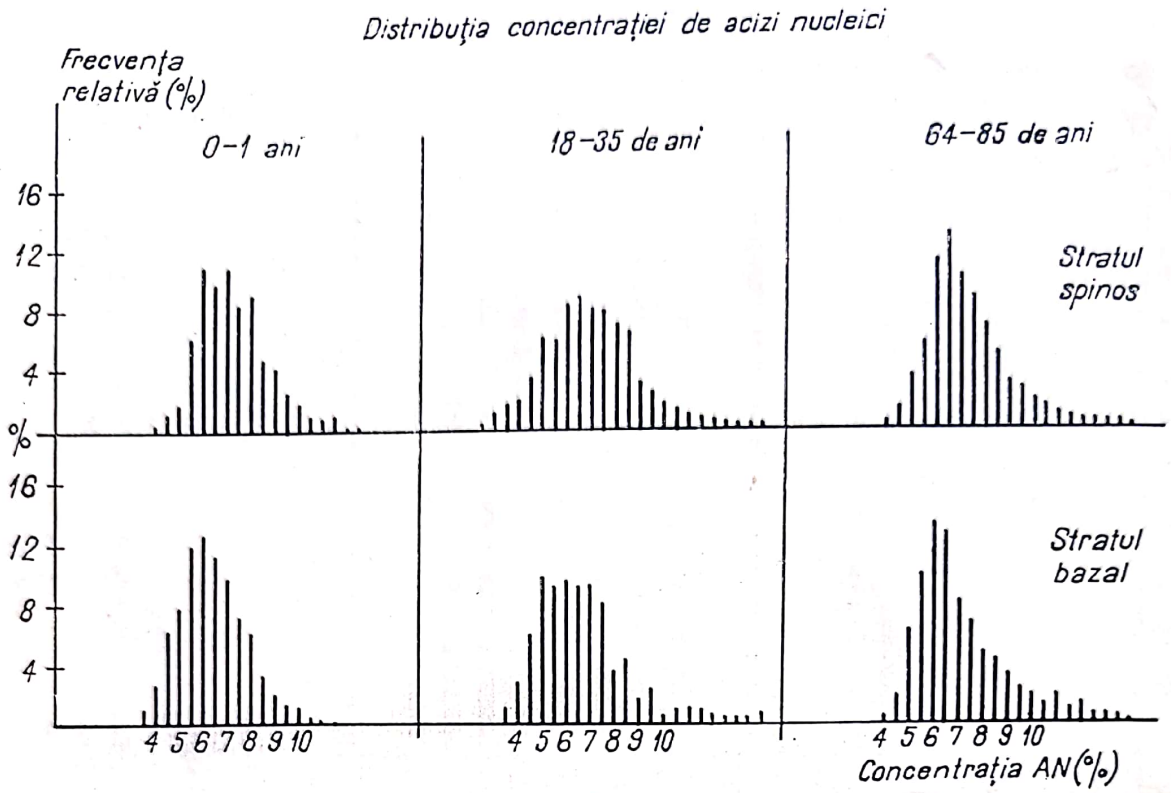



Fig. 33. — Histograma concentrației de acizi nucleici în epiderma umană. Concentrația acizilor nucleici rămîne constantă în decursul vieții.

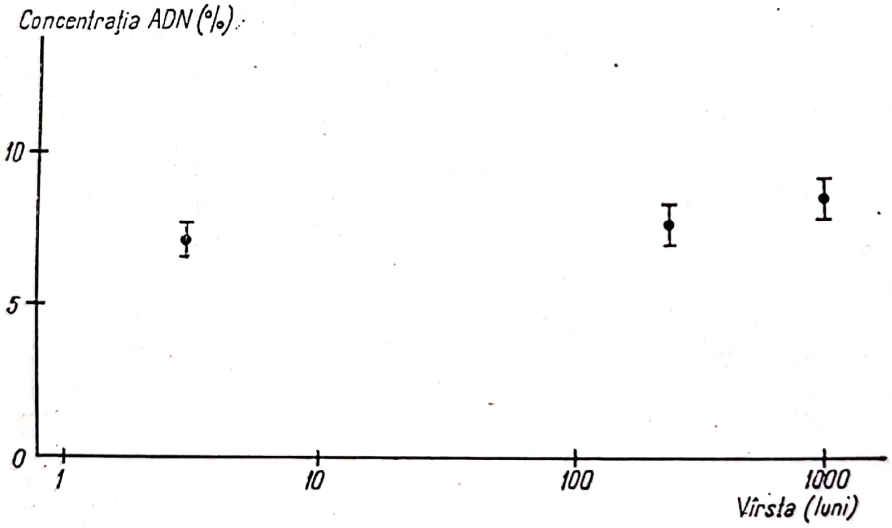



Fig. 34. — Corelații între concentrația de ADN și vîrsta. Concentrația ADN rămîne constantă în tot cursul vieții.

Analiza de regresiune, în scopul determinării raportului între cantitatea de acizi nucleici și volumul nuclear (M = c. V + constantă), indică o bună corelație între aceste două variabile. Într-adevăr în cazul reprezentat în figura 35 coeficientul de corelație este de 0,908.

Scanned with OKEN Scanner

În tabelul nr. 18 este redată cantitatea de acizi nucleici sub forma unei ecuații de gradul I pentru diferite grupe de vîrstă în straturile bazal și spinos.

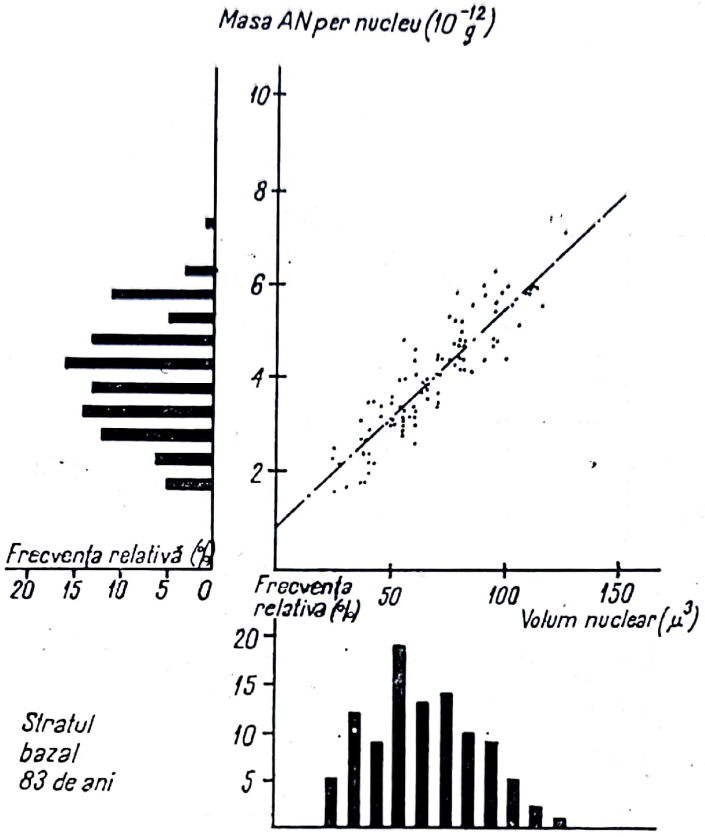



Fig. 35. — Analiza de regresiune privind corelația dintre volumul nuclear și cantitatea de acizi nucleici în celulele stratului bazal la un senescent de 83 de ani. Se remarcă o bună corelație între cele două valori.

*Tabelul nr. 18*

**Corelația dintre volum și conținutul în acizi nucleici în epiderma normală (după Tschahargane (540))**

| Grupa de vîrstă | Stratul bazal | Stratul spinos |
|---|---|---|
| Copii | M = 0,035 V + 4,25 | M = 0,057 V + 1,19 |
| Adulți | M = 0,034 V + 4,65 | M = 0,049 V + 1,94 |
| Senescenți | M = 0,047 V + 2,01 | M = 0,053 V + 1,07 |

*Notă.* M = cantitatea de acizi nucleici ($10^{-12}$g); V = volumul ($\mu^3$).

Cu ajutorul calculatorului electronic se apreciază cea mai exactă dreaptă posibilă (panta dreptei și intersecția cu axa OY) care se poate desemna prin aglomerarea de puncte reprezentînd fiecare cîte un nucleu.



Scanned with OKEN Scanner

În figura 36 sînt reprezentate dreptele de regresiune, calculate după procedeul menţionat pentru celulele epidermice din stratul bazal şi din cel spinos în diferite etape de vîrstă. În timp ce la copii şi adulţi dreptele au un traseu asemănător, diferind doar prin punctele de intersecţie cu

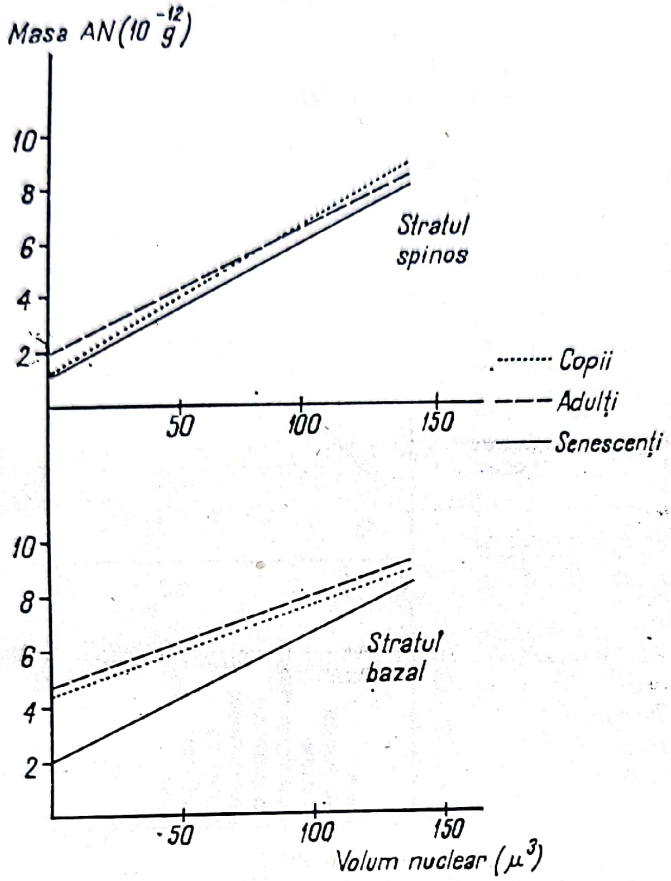



Fig. 36. — Relaţia liniară dintre cantitatea de acizi nucleici şi volumul nuclear în straturile bazal şi spinos ale epidermei la diferite grupe de vîrstă. Relaţia a fost calculată la computerul RPC 4 000 după formula : masa = concentraţia × volumul + constanta.

axa OY situate la foarte mică distanţă, la senescenţi, dreapta stratului bazal se caracterizează printr-o pantă mai abruptă şi un punct de intersecţie situat mai jos.

În figurile 37—39 este reprezentată relaţia liniară dintre cantitatea de acizi nucleici şi volumul nuclear în cîteva cazuri. Fiecare subiect este figurat prin cîte 100 de puncte, reprezentînd un nucleu, din straturile bazal şi spinos. Reiese că punctele stratului bazal sînt deplasate în sus şi spre dreapta în comparaţie cu stratul spinos. Se observă totodată că în stratul spinos coeficientul de corelaţie este mai mare şi că valorile obţinute la senescenţi sînt mai bine corelate decît la adulţi şi copii.

În epiteliul vaginal cercetările lui Schiemer şi Grossmann (491) au evidenţiat o creştere a masei uscate şi a volumului nuclear pînă în a 9-a zi a ciclului, urmate de diminuarea în special a volumului nuclear

către a 15-a zi. Criterii cantitative simple în frotiul vaginal pentru depistarea insuficienței folice au fost propuse de Klaus (304). Acestea constau în plicaturări nucleare peste 6%, nuclei dubli peste 2% și nuclei giganți peste 4%. Aceste semne preced deficiența folică clinică cu 8—10 săptămîni.

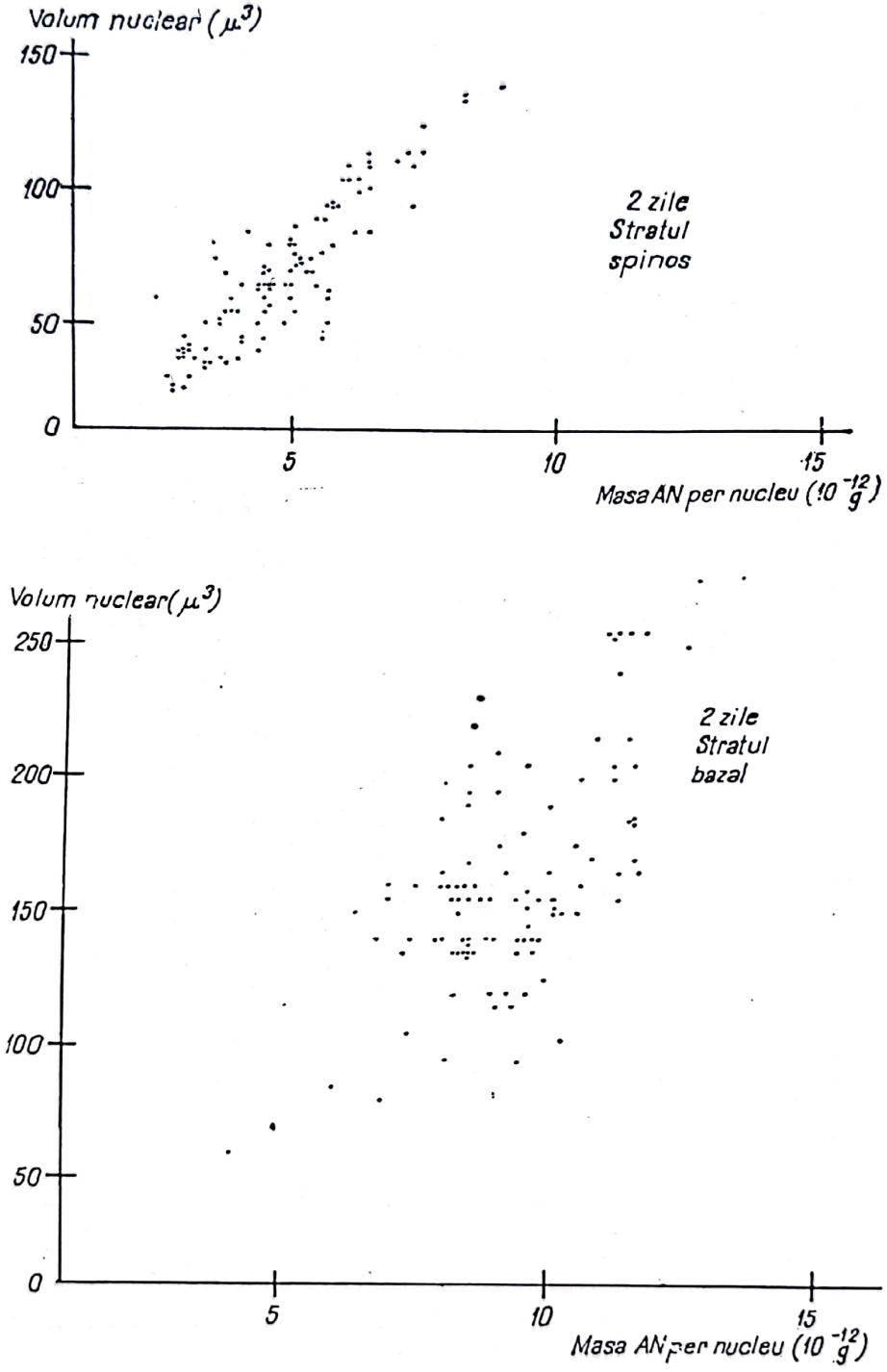



Fig. 37. — Relația dintre cantitatea de acizi nucleici și volumul nuclear în epiderma unui copil de 2 zile. Corelația este mai bună în stratul spinos.

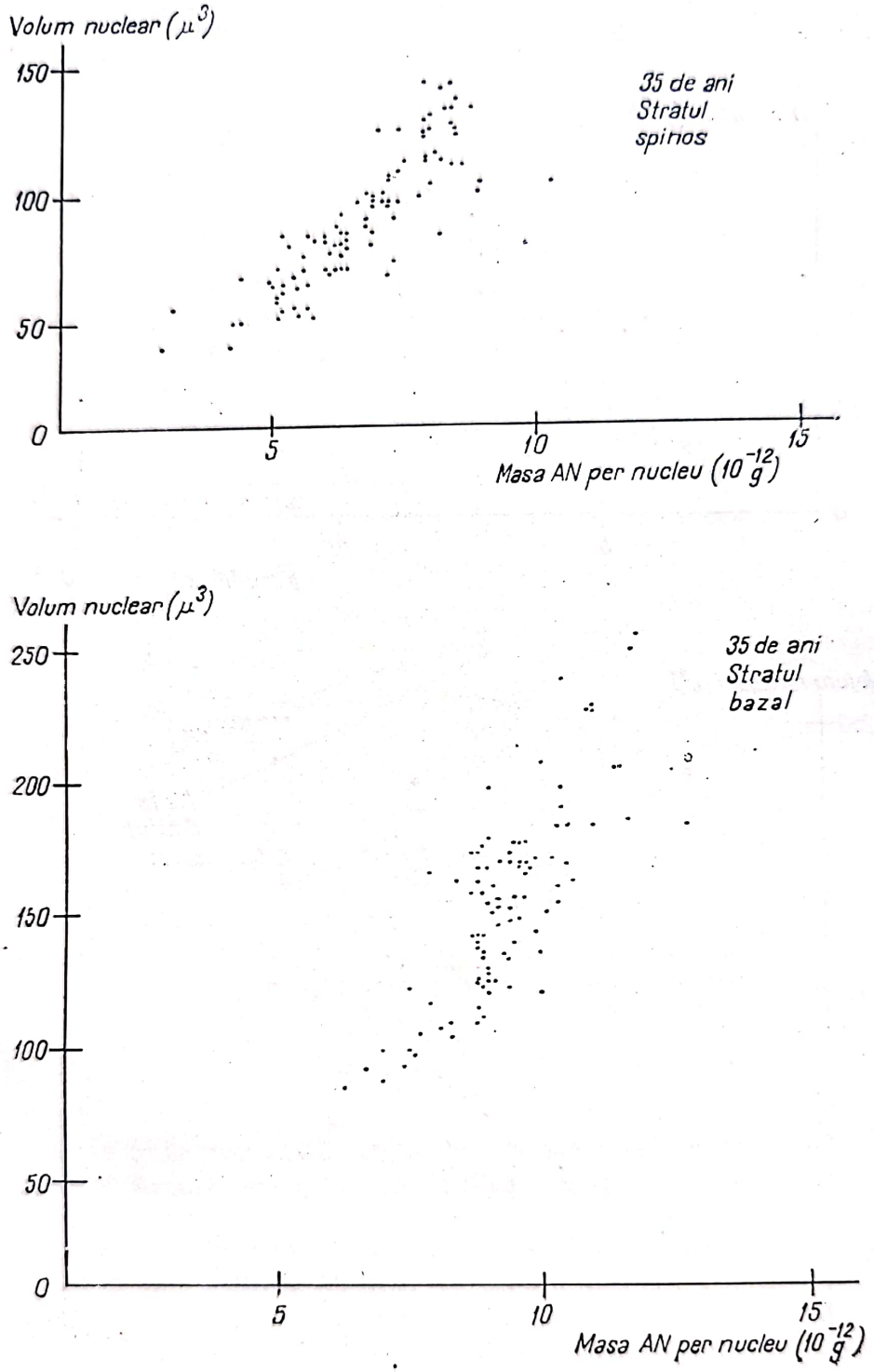



Fig. 38. — Relaţia dintre cantitatea de acizi nucleici şi volumul nuclear în epiderma unui adult de 35 de ani.

Scanned with OKEN Scanner

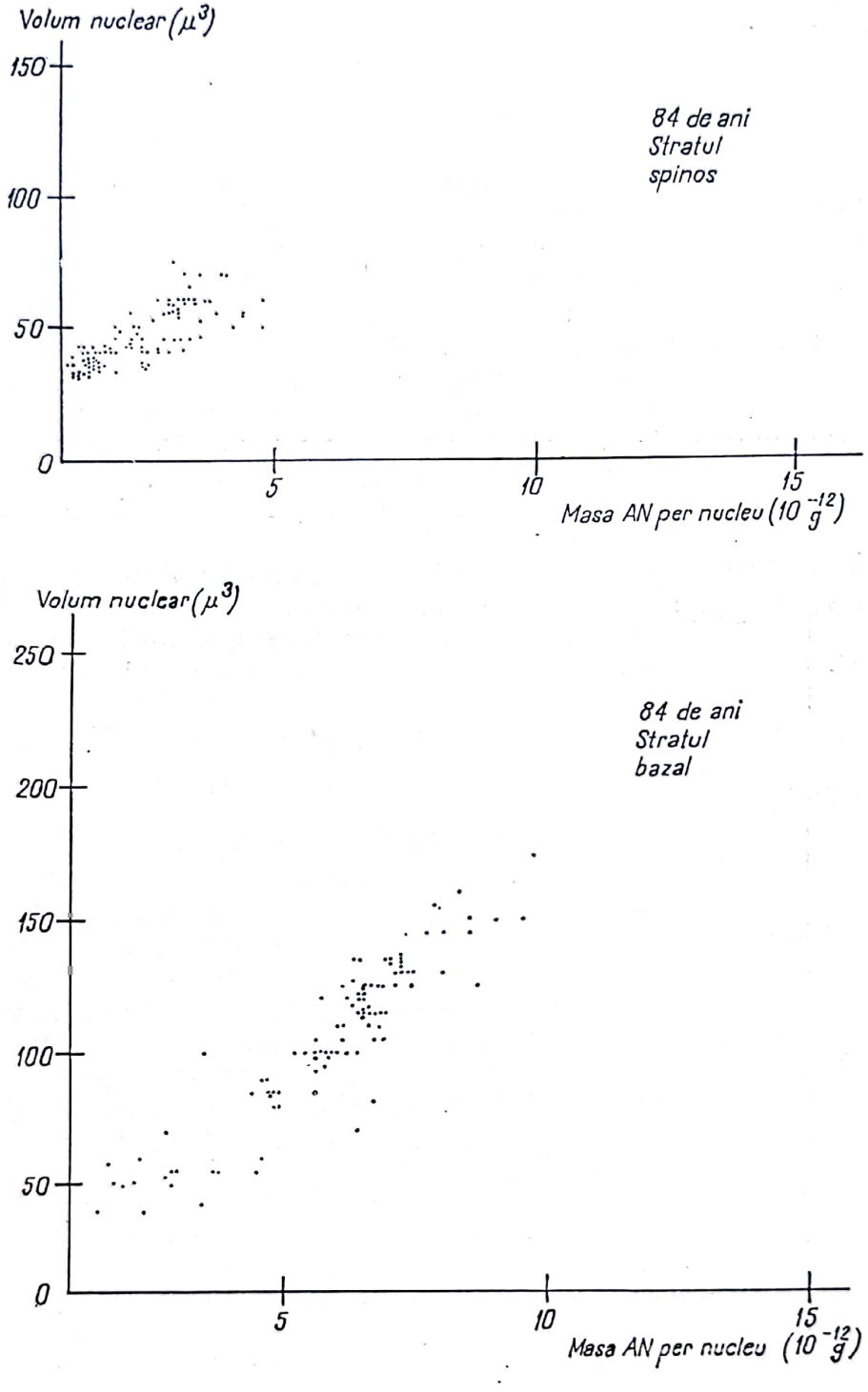



Fig. 39. — Relaţia dintre cantitatea de acizi nucleici şi volumul nuclear în epiderma unui senescent de 84 de ani. Coeficientul de corelaţie este în acest caz de 0,908, ceea ce traduce o foarte bună corelaţie între volumul nuclear şi cantitatea de acizi nucleici.

Scanned with OKEN Scanner

## Țesutul conjunctiv

Studiul cariometric al acestui țesut constituie adesea o problemă dificilă atît din cauza formei celulelor, cît și a permanentelor transformări pe care le suferă elementele celulare.

În marea majoritate a cazurilor microscopistul este confruntat cu multiple tipuri de celule conjunctive, greu de diferențiat în cursul măsurătorilor nucleare. Se recomandă măsurarea separată a fiecărui tip celular înainte de calcularea curbelor cariometrice. În general, aceste curbe sînt turtite, deviațiile standard sînt mari, numărul necesar de măsurători mai ridicat decît pentru alte populații celulare. Fibrocitele au nuclei cu o elongație de aproximativ 2 cu structură granulară. Este obligatorie folosirea unui material histologic cu unghiul de secționare constant. Histiocitele prezintă forme și mărimi variate corelate cu funcțiile lor. Nucleii sînt mai puțin alungiți (E = 1,4—1,6) decît ai fibroblaștilor.

Mastocitele au nuclei cu forme foarte variabile, rotunzi (E=1) sau net ovali (E=2,5) datorită deosebirilor funcționale.

Țesutul adipos are o mare varietate de nuclei, ovoizi sau alungiți, cu volume între 26 și 174 $\mu^3$ (409).

Sterba (510) observă că mărimea nucleului adipocitelor prezintă variații sezoniere și depinde de talia animalului.

Măsurătorile efectuate în țesutul cartilaginos indică nuclei ovoizi în cartilajele hialin și elastic (E=1,3) și ceva mai rotunzi în fibrocartilaj (E = 1,15 %).

La nivelul osului, elongația nucleului atinge valori mari (E=2,2—3,2).

## Miocardul

Miocardul se pretează bine la măsurători nucleare, dat fiind faptul că dispunerea nucleilor este aceeași în secțiunile orientate identic.

Mărimea nucleilor miocardici variază în cursul dezvoltării. La nounăscut, nucleii sînt mai alungiți și mai subțiri decît la adult. La om, către vîrsta de 10 ani, volumul nuclear atinge valoarea de la adult (150$\mu^3$). În cursul perioadei de creștere raportul N/P scade treptat.

Curbele cariometrice ale nucleilor miocardici prezintă de obicei 2—3 vîrfuri, maximele principale fiind la 7 și 14 $\mu$ (414). Forma traseului sugerează fie prezența a două tipuri celulare, fie stări funcționale diferite ale aceleiași celule (409).

Sporirea frecvenței ritmului cardiac sub acțiunea adrenalinei atrage apariția unui platou în traseul cariometric, datorită creșterii numărului celulelor de tranziție între cele două faze. Cordul răspunde la stress prin mărirea numărului celulelor în activitate maximă.

Țesutul de conducere specific prezintă nuclei cu volum mult mai mare decît cei ai țesutului miocardic obișnuit. Hintzsche (270) găsește în țesutul cardiac specific la viței volume nucleare de 300—4 800 $\mu^3$.

Microscopia cantitativă a adus contribuții foarte importante la cunoașterea dezvoltării miocardului embrionar. Determinările volumelor nucleare ale mioblaștilor embrionari asociate cu aprecierea cantității de

Scanned with OKEN Scanner

ADN constituie un gradient de cantificare a intensității metabolismului. Cercetări efectuate de Erhard (163) pe miocardul de embrion de pui de găină sînt foarte instructive din acest punct de vedere. Autoarea a utilizat embrioni de pui menținuți la termostat la 39°C. Miocardul a fost prelevat la 72, 96, 120, 216, 240 și 264 de ore.

În imaginile histologice colorate prin metoda Feulgen se constată că, odată cu vîrsta embrionilor, intensitatea colorației nucleilor se reduce. Foarte evidentă apare diminuarea conținutului în acizi nucleici la embrionul de 264 de ore (fig. 40) în comparație cu embrionul de 72 de ore (fig. 41) în imaginile obținute în lumină ultravioletă la 260 mμ.

Rezultatele măsurătorilor citofotometrice la UMSP I sînt redate în tabelul nr. 19.

*Tabelul nr. 19*

**Valorile medii ale volumului nuclear, cantității și concetrației de ADN în miocardul de embrion de pui de găină (după Erhard (163))**

| Vîrsta ore | Volumul $\mu^3$ | Masa ADN $10^{-12}$g | Concentrația ADN % |
|---|---|---|---|
| 72 | 147 | 9,21 | 6,54 |
| 96 | 163 | 8,85 | 5,67 |
| 120 | 146 | 6,88 | 4,99 |
| 216 | 144 | 5,65 | 4,08 |
| 240 | 161 | 6,48 | 4,07 |
| 264 | 132 | 4,47 | 3,64 |

Așa cum rezultă din tabelul nr. 19 și din figura 42, în care este reprezentată corelația volumului nuclear cu durata de incubare, se observă o constanță destul de evidentă a valorilor volumetrice. O scădere marcantă a conținutului în ADN concomitentă cu durata incubării se poate observa în figura 43. La 72 de ore conținutul ADN este $9{,}21 \times 10^{-12}$ g, dar scade la $4{,}47 \times 10^{-12}$ g după 264 de ore. Aceeași scădere se constată și pentru concentrația ADN : de la 6,54 % la 72 de ore la 3,64 % la 264 de ore (fig. 44). Rezultate asemănătoare apar și în histogramele din figura 45. Se remarcă faptul că maximele distribuției volumetrice sînt situate în aceeași regiune în toate intervalele de timp examinate, în timp ce pentru cantitatea de ADN vîrfurile curbelor se deplasează spre stînga la sfîrșitul perioadei de incubație. O levodeviere evidentă în etapele tardive de incubație apare și pentru concentrația ADN.

Corelația dintre volumele nucleare și cantitatea de ADN a fost stabilită cu ajutorul analizei de regresiune. Legătura liniară dintre volume și cantitatea de ADN se exprimă prin ecuațiile :

$M_{72h} = 0{,}038\ V + 1{,}88$ ;

$M_{264h} = 0{,}022\ V + 1{,}39$.

Cele două mărimi sînt bine corelate, întrucît coeficientul de corelație este de 0,8.

Procesul de creștere embriofetal a fost relativ rar exprimat cantitativ (37), (126), (163), (206), (207), (208), (217), (228), (343), (381), (450), (496). Așa cum reiese din cercetările lui Goerttler (206), (207), Grohman (217) și Erhard (163) faza metabolică cea mai activă din cursul dezvoltării embrionare la puiul de găină este situată între a 2-a și a 6-a zi de incubație.

Scanned with OKEN Scanner

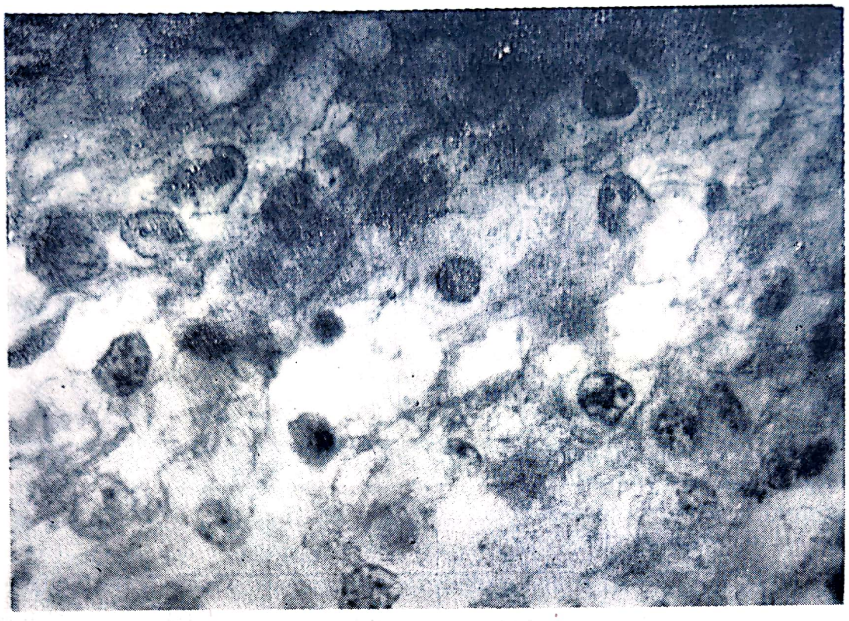


Fig. 40. — Miocard de embrion de pui de găină de 264 de ore. Cantitate relativ redusă de acizi nucleici. Fotografie în lumină ultravioletă (× 1 000).

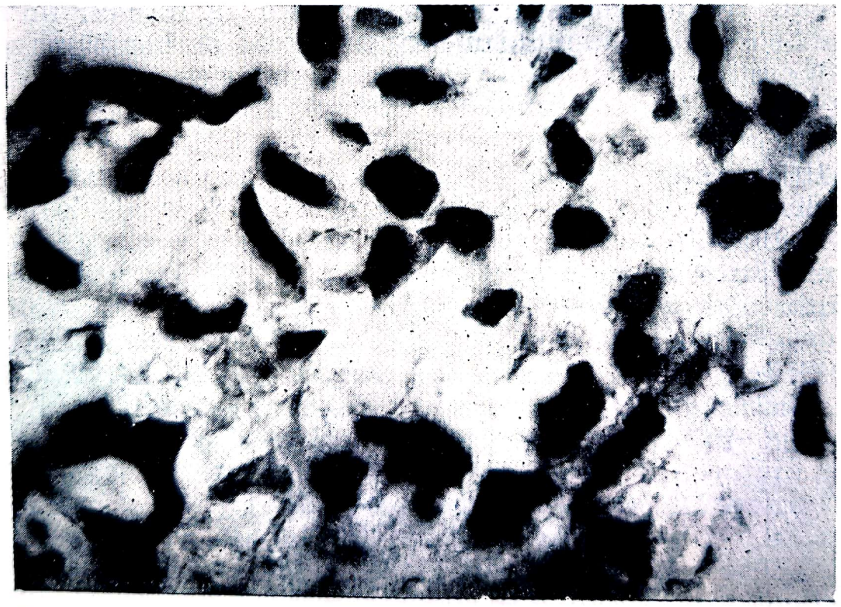
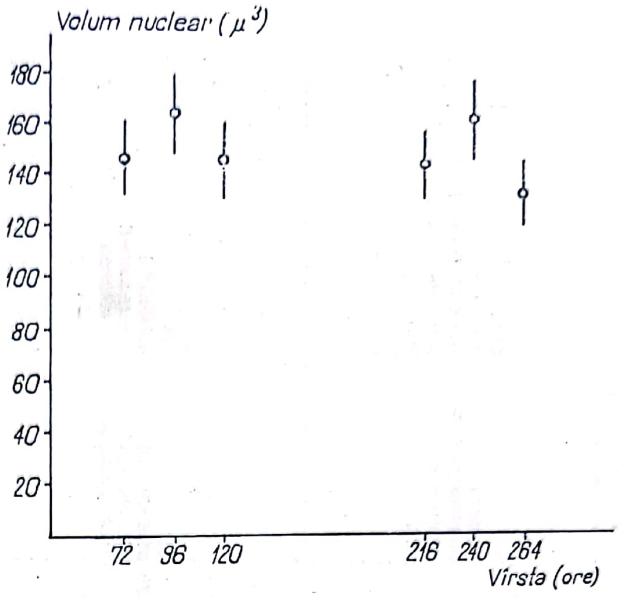


Fig. 41. — Miocard de embrion de pui de găină de 72 de ore. Cantităţi mari de acizi nucleici. Fotografie în lumină ultravioletă (× 1 000).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 42. — Corelația volumelor nucleare cu vîrsta la embrion. Se remarcă constanța volumelor nucleare în cursul dezvoltării.



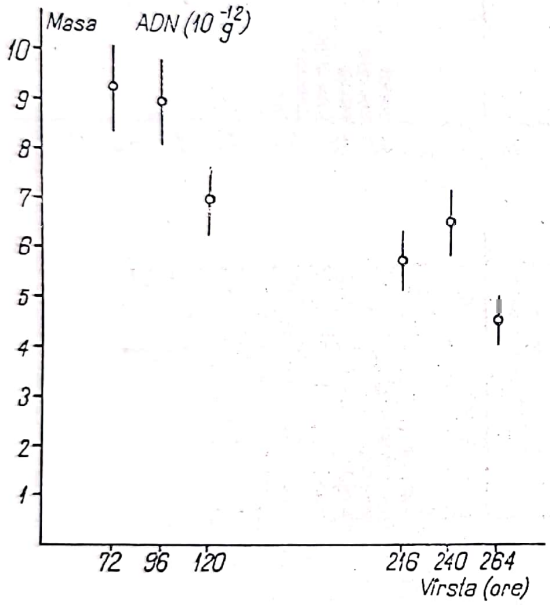




Fig. 43. — Scăderea conținutului de ADN paralel cu vîrsta la embrionul de pui de găină.

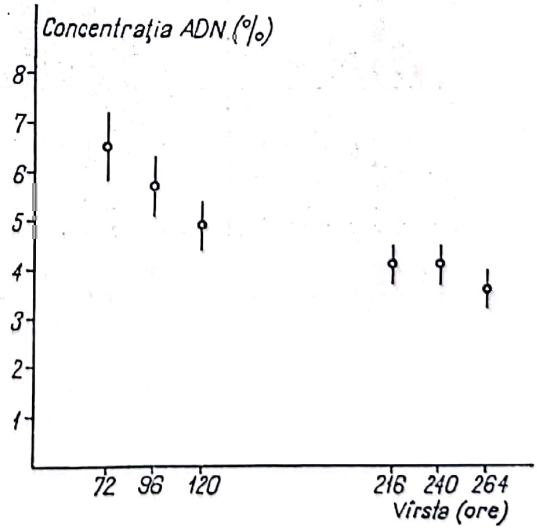



Fig. 44. — Scăderea concentrației de ADN paralel cu vîrsta la embrionul de pui de găină.

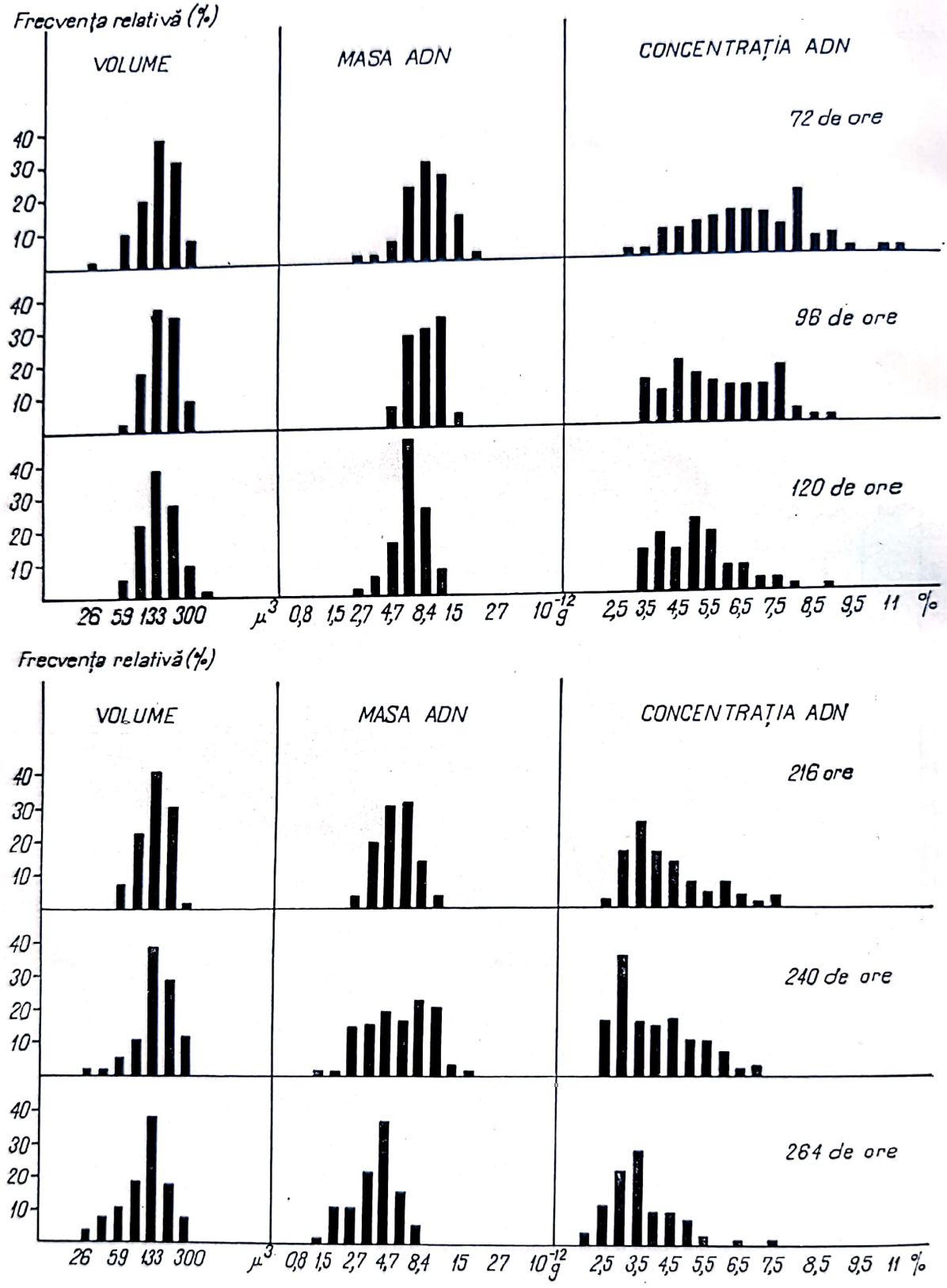



Fig. 45. — Histogramele volumelor, cantității și concentrației de ADN în nucleii miocardului de pui de găină. Se remarcă constanța volumelor și scăderea masei și concentrației de ADN paralel cu vîrsta.

Scanned with OKEN Scanner

Este de remarcat de asemenea diminuarea cantităţii de eucromatină şi creşterea heterocromatinei în cursul embriogenezei. Cea mai plauzibilă explicaţie pentru cantitatea crescută de ADN din stadiile de dezvoltare precoce embrionară este ipoteza că în acest moment un mare număr de celule sînt în faza S, iar procesele de mitoză şi faza $G_1$ se desfăşoară mai rapid.

În baza corelaţiei bune (coeficienţii de corelaţie sînt între 0,6 şi 0,9) între volumul nuclear şi conţinutul în acizi nucleici se poate afirma că aceste două mărimi evoluează sincron. Dreptele de regresiune din figura 46 demonstrează că în stadiile precoce de embriogeneză se sintetizează o

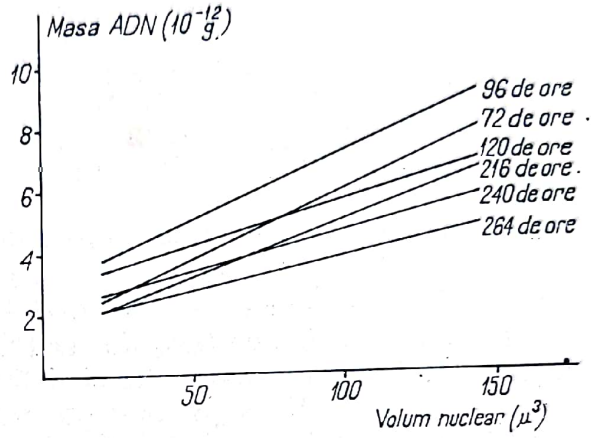



Fig. 46. — Corelaţia dintre volumul nuclear şi cantitatea de ADN la embrionul de pui de găină. La 96 de ore corelaţia este mai bună decît la 264 de ore.

cantitate mai mare de ADN. Acest rezultat concordă cu observaţiile lui Grohman (217) privind frecvenţa sporită a mitozelor în embriogeneza timpurie. Dealtfel începînd din ziua a 22-a după naştere nu se mai observă mitoze în miocardul de şobolan (305).

Hiperfuncţia şi hipertrofia cardiacă din stenoza aortică se însoţesc de o activare a sintezei ADN şi a numărului de mitoze. Proliferarea reactivă este maximă la două săptămîni, cînd 1,6 $\pm$ 0,6 % din miocite sintetizează ADN, iar 0,96 $\pm$ 0,44 % sînt în mitoză (459).

## *Eritrocitul embrionar*

Ortologia tabloului sanguin embrionar poate aduce date utile pentru o mai bună cunoaştere a modificărilor care apar la adult. Cercetările lui Schiemer şi Goerttler (490) pe eritrocite de la embrionul de pui de găină, puiul de 2 zile şi găina adultă constituie o contribuţie importantă nu numai la variaţiile masei uscate şi ADN din hematii, dar şi la oscilaţiile acestor parametri în corelaţie cu vîrsta.

Valorile medii ale greutăţii uscate în nucleul şi citoplasma hematiei scad continuu de la embrionul de 6—12 zile la puiul de 2 zile, pînă la găina adultă (tabelul nr. 20).

Cercetări comparative ale altor autori dau pentru greutatea uscată a nucleului hematiei la găină următoarele valori: $10{,}5 \times 10^{-12}$ g (369)

și $8,5 \times 10^{-12}$ g (7). Greutatea totală medie a eritrocitului oscilează de la $43,9 \times 10^{-12}$ g după Mirsky și Ris (382) la $44,3 \times 10^{-12}$ g după Mellampy (369).

*Tabelul nr. 20*

**Volumul și greutatea uscată ale nucleului și citoplasmei în cursul dezvoltării la păsări (după Schiemer și Goerttler (490))**

| Stadiul de dezvoltare | Structura investigată | Volum $\mu^3$ | Greutate uscată $10^{-12}$ g |
|---|---|---|---|
| Embrionar 6 zile | nucleu | 63,2 | 15,5 |
| | citoplasmă | 362,4 | 34,9 |
| Embrionar 11—12 zile | nucleu | 63,6 | 12,9 |
| | citoplasmă | 379,3 | 33,8 |
| Pui de 2 zile | | 57,5 | 11,8 |
| | nucleu | 375,8 | 30,7 |
| Găină adultă | nucleu | 45,8 | 9,5 |
| | | 314,0 | 31,2 |

Numărătoarea eritrocitelor indică la embrionul de 6 zile, în medie, 255 000, la 12 zile 1,5 milioane, iar la pasărea adultă 2,42 milioane.

Determinările biochimice și histofotometrice ale ADN în cursul diferitelor trepte de dezvoltare ale eritrocitului de pasăre sînt redate în tabelul nr. 21. La examinarea acestui tabel atrage atenția scăderea continuă a cantității de ADN per nucleu în raport cu vîrsta, și anume de la $2,36 \times 10^{-12}$ g la embrionul de 12 zile pînă la $1,00 \times 10^{-12}$ g la găina adultă.

*Tabelul nr. 21*

**Determinări biochimice și histofotometrice ale ADN în eritrocitul de pasăre în cursul dezvoltării (după Schiemer și Goerttler (490))**

| Stadiul de dezvoltare | Determinări biochimice ale ADN $10^{-12}$ g | Stadiul de dezvoltare | Determinări histofotometrice ale ADN (Feulgen) $10^{-12}$ g | Date comparative ale altor autori |
|---|---|---|---|---|
| Embrionar 12 zile | 2,36 | 4—6 zile | 2,41—2,65 | |
| | | 11—12 zile | 1,89—2,75 | |
| Postfetal pui | 2,00 | găină adultă | 1,11 | 2,34 (Mirsky și Ris (382)) |
| găină adultă | 1,00 | | | 2,4—2,58 (Davidson și Leslie (113)) |
| | | | | 3,3—3,5 (Sandritter (467)) |
| | | | | 3,1 (Walker (551)) |

Estimarea concentrației ADN în nucleii hematiilor la embrionul de pui de găină indică o creștere a valorilor de la 13 % în ziua a 4-a la 20 % în ziua a 11-a (490). Valori asemănătoare au fost constatate de Allfrey și Mirsky (7).

Scanned with OKEN Scanner

Datele prezentate la Schiemer şi Goerttler (490) corespund concepţiei formulate mai de mult de Rössle şi Roulet : odată cu creşterea în vîrstă scade greutatea organelor. În acest sens, ontogeneza poate fi privită ca o „evoluţie spre moarte" (Goerttler (208)), iar diminuarea, dependentă de timp, a substanţei structurate (şi deci a funcţiei) ca o exemplificare a legilor entropiei : diferenţierea celulară ar însemna pierderea matricei substanţiale.

## *Ţesutul limfo-reticulo-histiocitar*

Puţine capitole din patologie au suferit în ultima vreme atît de mari prefaceri ca acela al afecţiunilor sistemului limfo-reticulo-histiocitar. Cercetările de cariometrie ale lui Lennert şi Remmele (336) au stabilit că nucleii celulelor reticulare aparţin atît claselor nucleare principale, cît şi celor intermediare — Jacobj (tabelul nr. 22).

*Tabelul nr. 22*

**Valorile cariometrice ale celulelor reticulare (după Lennert (335))**

| Tipul celular investigat | Clasa de dimensiuni |
|---|---|
| Celule reticulare limfoide mici | $K_{1/4}-K_{3/8}$ (36—51 $\mu^3$) |
| Celule reticulare mijlocii | $K_{1/2}-K_{3/4}$ (72—102$\mu^3$) |
| Celule reticulare mari | $K_1-K_{11/2}$ (144—204 $\mu^3$) |
| Histocite tinere | $K_{1/2}$ (72 $\mu^3$) |
| Epiteloide intumescente | $K_{11/2}$ (204 $\mu^3$) |

Procentul cel mai însemnat de celule reticulare din pulpa ganglionului şi din sinusuri aparţine volumelor mijlocii. În cazul unei proliferări medii, predomină volumele clasei intermediare; în proliferări intense nucleii sînt situaţi în clasa principală ($K_{1/2}$) şi în clasa intermediară corespunzătoare ($K_{3/4}$). În regenerările foarte active apar celule mici de 36 $\mu^3$ ($K_{1/4}$) şi de 51 $\mu^3$ ($K_{3/8}$), dar şi elemente reticulare mari de 144 $\mu^3$ ($K_1$) şi 204 $\mu^3$ ($K_{1/1/2}$).

Volumele nucleare ale elementelor limfopoietice sînt cuprinse între 18 şi 576 $\mu^3$ : germinoblaştii prezintă volume de la 72 la 576 $\mu^3$; limfoblaştii au vîrful maxim al volumelor la 72 $\mu^3$, limfocitele sînt situate în două clase : majoritatea („limfocite tinere", Lennert) au maximul la 36 $\mu^3$, iar o mică parte („limfocite mature", Lennert) au volume de 18 $\mu^3$.

Urmărind volumele nucleare ale plasmocitelor şi etapelor premergătoare, Lennert (335) le împarte în 4 clase, situate în raportul 1 : 2 : 4 : 8, avînd valorile între 51 şi 408 $\mu^3$, după cum urmează : plasmocitele 51$\mu^3$ ($K_{3/8}$), proplasmocitele 102 $\mu^3$ ($K_{3/4}$), plasmoblastele 204 $\mu^3$ ($K_{1/2}$), proplasmoblastele 408 $\mu^3$ ($K_3$).

În materialul nostru (523), cariograma limfoganglionului normal se prezintă astfel : 20 % limfocite mici (19 $\mu^3$), 70 % limfocite mari (39 $\mu^3$), 4 % retocite mici (38 $\mu^3$), 2 % retocite mijlocii (76 $\mu^3$), 2 % retocite mari (152 $\mu^3$), 2 % retotelii mici (76 $\mu^3$).

Scanned with OKEN Scanner

Urmărind prin metode planimetrice şi statistice corelaţiile dintre vîrstă şi histodinamică în organele limfoide, Onea şi colab. (398), precum şi Mihoc şi colab. (377) constată la bovidee o creştere treptată a suprafeţei totale a ganglionului de la nou-născut la animalele vîrstnice. Ţesutul limfoid scade treptat, atingînd minimum la animalele bătrîne. Locul său este luat de proliferarea conjunctivă. În cursul ontogenezei limfoganglionului, zona medulară suferă cele mai multe modificări cantitative. Corelaţii semnificative au fost întîlnite în sinusurile medulare.

Lucări numeroase au fost consacrate de către şcoala de la Iaşi morfologiei cantitative a limfoganglionilor, splinei, timusului şi măduvei osoase în cursul proceselor de apărare antiinfecţioasă (49), (139), (200), (201), (402), (445). Autorii respectivi discută rolul sistemului nervos central în cursul instalării imunităţii, tradus prin aspectele dinamicii proliferării, diferenţierii şi involuţiei celulare din sistemul reticulo-histiocitar.

Determinările de ADN în limfocitele tisulare şi în histiocite corespund unui conţinut diploid. Cantitatea de histone scade de la 3,1 $\pm$0,8 unităţi arbitrare în limfocite la 2,4$\pm$0,8 unităţi arbitrare în histiocite (432). Conţinutul total de proteine nucleare, colorat cu galben naftol, creşte de la 8,1$\pm$1,7 la 12,7$\pm$4,3 unităţi arbitrare.

Dozările de ADN în leucocite au dat rezultate contradictorii; după Rasch şi colab. (436), precum şi după Stich şi colab. (511), leucocitele prezintă, indiferent de tip, cantităţi egale de ADN, în timp ce Garcia (189), (190), Mayall (364), Sullivan şi Garcia (517) constată că granulocitele au un conţinut de ADN mai bogat decît limfocitele. Este interesant că în 1956 la începutul studiilor citofotometrice, Atkin şi Richards (21), (22), dar şi mai tîrziu, în 1965 Hale şi Cooper (226) considerau că leucocitele au o cantitate mai redusă de ADN în comparaţie cu celelalte celule somatice. Pare însă mai probabil că n-ar fi vorba de o inconstanţă a cantităţii de ADN, ci de grade variabile de „compactizare" a cromatinei (190), (211), (364), (365).

Observaţiile noastre de leziuni ale limfoganglionilor au fost clasificate în reticulopatii inflamatorii, dismetabolice şi tumorale.

*Reticulopatiile inflamatorii.* În cazuistica noastră acestea se prezintă sub trei aspecte: hiperplazie retocitară în plaje, hiperplazie retocitară difuză şi hiperplazie pseudosarcomatoasă (523).

Corelînd datele morfologice cu cele cariometrice se obţin valorile din tabelul sinoptic nr. 23.

Din observaţii reiese că, paralel cu evoluţia reticulopatiilor inflamatorii, traseele cariometrice devin mai accidentate, sporeşte volumul nuclear mediu şi procentajul claselor intermediare. În celulele epitelioide cantitatea de ADN şi de histone corespunde teritoriului diploid. O creştere a ADN se constată în celulele gigante Langhans. În histiocite şi epitelioide cantitatea totală de proteine este corelată cu suprafaţa nucleară.

*Reticulopatii dismetabolice.* Curba cariometrică din limfoganglioni în cursul bolii Niemann-Pick indică o acumulare de volume corespunzînd nucleilor retocitari şi retoteliali mici şi mijlocii, deoarece 85% din valorile obţinute sînt sub 150 $\mu^3$. Clasele nucleare sînt repartizate inegal: microretocite 12%, mezoretocite 42%, retotelii 28%. Numai 28% din elemente sînt situate în clasele principale: 12% retocite mici şi 16% retotelii, în timp ce 14% retocite mici, 42% retocite mijlocii şi 12% retotelii

*Tabelul nr. 23*

**Corelații histiocariometrice în reticulopatiile inflamatorii**

| Tipul de reticulopatie | Volum nuclear $\mu^3$ | | | Maximele curbei cariometrice % | | | | Clase nucleare principale % | Clase nucleare intermediare % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | minim | maxim | mediu | 19 $\mu^3$ | 38 $\mu^3$ | 49 $\mu^3$ | 76 $\mu^3$ | | |
| Hiperplazie retocitară în plaje | 19 | 308 | 56 | — | 27 | 24 | 24 | 60 | 40 |
| Hiperplazie retocitară difuză | 19 | 641 | 92 | — | 14 | — | 28 | 55 | 55 |
| Hiperplazie retocitară pseudosarcomatoasă | 19 | 641 | 109 | 15 | — | — | 25 | 44 | 56 |

sînt situate în clasele intermediare. Volumul nuclear mediu este de 111$\mu^3$. Distanțele internucleare oscilează între 1,17 și 17,12 $\mu$, cu maximul între 5 și 9 $\mu$.

În maladia Gaucher se observă predominanța (6%) nucleilor de 38—152 $\mu^3$. Nucleii mari de 200—640 $\mu^3$ apar în 34% din total. Traseul cariometric prezintă două vîrfuri de amplitudine egală (20%) la 50 și 152$\mu^3$.

Maladia Letterer-Siwe prezintă în concordanță cu observațiile morfologice o concentrație maximă pentru retocite și histocite mijlocii, deoarece 92% din volume sînt sub 150 $\mu^3$. Volumul mediu este 160 $\mu^3$. Distanțele internucleare sînt distribuite între 1 și 10 $\mu$ cu predominanța intervalului de 5 $\mu$.

## *Tubul digestiv*

### Cavitatea bucală

Pentru simplificare putem considera epiteliul bucal format din trei zone. Zona cea mai superficială constă din celule în curs de descuamare. Nucleii apar alungiți, picnotici. Celulele stratului mijlociu sînt bogate în glicogen, cu nuclei relativ mari, sferoidali. Nucleii stratului profund sînt mici și rotunzi.

Nucleii epiteliului lingual prezintă diferențe importante de la o porțiune la alta a limbii, în funcție de tipul papilelor.

Dinții se pretează cu ușurință la studii cariometrice. Măsurătorile pot fi efectuate pe celulele din stratul intermediar, pulpă, epiteliul intern, ameloblaste. În cursul dezvoltării, volumul nuclear al celulelor epiteliale se mărește, în timp ce nucleii din pulpă scad.

Scanned with OKEN Scanner

## Stomacul

Epiteliul glandular gastric constă din trei tipuri celulare. Nucleii celulelor principale sînt rotunzi (E = 1,15) şi sînt situaţi în porţiunea bazală a celulelor. Celulele parietale au nuciei ceva mai alungiţi (E=1,28). Celulele mucoase ale colului glandelor prezintă nuclei alungiţi (E=1,33) dispuşi în coloane.

Într-o secţiune verticală prin mucoasa fundică se observă 3 zone, regiunea coletului glandelor corespunzînd deschiderii criptelor gastrice. Predomină celulele mucoase. În zona mijlocie sînt frecvente celulele parietale şi principale. Zona bazală constă exclusiv din celule parietale şi principale.

Zona pilorică prezintă glande mucoase, cu celule înalte, cilindrice cu nuclei ovoizi (E=1,2) situaţi în porţiunea bazală.

Glandele din regiunea cardiei au un epiteliu cilindric cu nuclei ovoizi.

Corelaţii importante au fost stabilite între funcţia gastrică şi volumul nuclear: după administrare de atropină volumul nuclear al celulelor principale şi parietale creşte, în timp ce histamina determină diminuarea nucleilor celulelor parietale şi creşterea nucleilor celulelor principale (414). ACTH atrage diminuarea sintezei ADN în stomacul şi duodenul şoarecelui, tradusă prin scăderea indicelui de marcare cu timidină (322).

## Intestinul

Volumul nuclear al epiteliului intestinal este practic constant în toate porţiunile. Nucleii din epiteliul de suprafaţă sînt ovali (E=1,4) şi dispuşi în coloană; decurge de aici importanţa orientării secţiunilor.

Nucleii celulelor Paneth şi ai celulelor enterocromafine sînt dificil de identificat în coloraţiile uzuale. Distincţia necesită coloraţii speciale şi are importanţă în separarea celor două tipuri celulare, ţinînd seama mai ales de rolul endocrin al celulelor enterocromafine.

Volumul nuclear din glandele Brunner variază în funcţie de activitatea celulară. Ca o remarcă generală nucleii epiteliului intestinal prezintă mari variaţii în legătură cu funcţia celulei. La şoarecii supuşi postului, nucleii sînt mici. După alimentaţie, volumul nuclear creşte treptat dinspre duoden spre colon. Adăugarea de NaCl în alimentaţie atrage apariţia de macronuclei în porţiunea superioară a intestinului subţire, datorită intensificării resorbţiei (155).

## Pancreasul exocrin

Nucleii acinilor pancreatici sînt în general rotunjiţi (E=1,1). Modificări nucleare au fost observate în perioada secretorie celulară. O corelaţie între volumul nuclear şi cantitatea de ADN a fost constatată numai în perioada de creştere a volumului nuclear. Postul determină scăderea volumului nuclear; pilocarpina are rezultate contrare. Acest efect este bifazic, aşa cum rezultă şi din investigaţiile autoradiografice privind sinteza proteică cu $^{3}$H-leucină şi $^{3}$H-citidină.

Scanned with OKEN Scanner

## Ficatul

În unul din primele comentarii asupra semnificației mărimii nucleare în condiții patologice, Morpurgo (385) în 1898 constata că nucleii hepatici la animalele în stare de post sînt cu aproape 1/7 mai mici decît la normali. După realimentare apar numeroși nuclei mari.

Caspersson și Holmgren (77) observă variații diurne ale mărimii nucleare, volumele fiind mai mari noaptea. Această creștere de mărime a fost corelată cu cantitatea de glicogen din citoplasmă și se consideră a fi un semn de activitate celulară înaltă.

Ficatul s-a bucurat de mult de atenția celor interesați în cercetări de microscopie cantitativă. Beams și King (34) găsesc curbe de distribuție bimodală atît la normali, cît și la șobolanii parțial hepatectomizați, dar la ultimul grup curba este deplasată spre dreapta cu prezența de nuclei mari. Studiile lui Sulkin (515), (516), efectuate tot pe ficatul de șobolan, au dus la rezultate diferite. Autorul observă trasee cu 3 vîrfuri modale. Folosind volumul nuclear ca singur criteriu pentru gradul de ploidie, Sulkin (516) consideră că 12 % din nucleii hepatici sînt diploizi, 79 % tetraploizi și 0,4 % 16-ploizi. În ficatul restant după 28 de zile de la hepatectomie același autor observă 6 % nuclei diploizi, 68 % tetraploizi, 22 % octoploizi și 3,8 % 16-ploizi. Aceste estimări se bazează pe înălțimea vîrfurilor modale.

În cercetările noastre (523), (524) de cariometrie am constatat pentru traseele cariometrice din ficatul normal că vîrful curbei este situat la 137 $\mu^3$. Distanța internucleară prezintă un singur maxim (fig. 47).

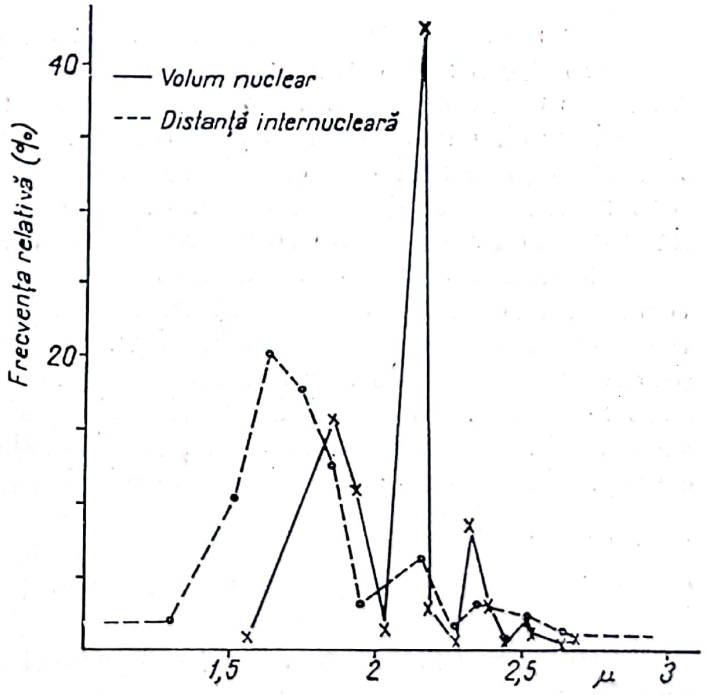



Fig. 47. — Cariograma și intercariograma ficatului uman normal.

Hintzsche (269), criticînd rezultatele lui Sulkin, argumentează că este greu de deosebit nucleii unei clase cu ploidie mare de nucleii clasei inferioare, în curs de diviziune; de asemenea volumul nuclear ca atare nu este un criteriu adecvat pentru gradul de ploidie.



Scanned with OKEN Scanner

Pe măsurători efectuate pericentrolobular în ficatul normal şi în regenerare, Sulkin (516) găseşte un număr mai mare de nuclei octoploizi şi 16-ploizi la animalul de control, curba fiind similară cu cea a întregului lobul din ficatul în regenerare. Măsurători pericentrolobulare pe ficatul în regenerare prezintă 5 vîrfuri modale, precum şi schiţa celui de-al 6-lea vîrf (nuclei 32-ploizi). Aceste fapte au sugerat lui Sulkin (516) o regenerare lentă şi continuă în regiunea centrală a lobulului.

Stowell şi Lee (514) observă la 6 ore după hepatectomie parţială o creştere a volumului citoplasmatic, nuclear şi nucleolar. Volumul nuclear mediu creşte de două ori, iar volumul nucleolar de patru ori. Nu există dovezi pentru poliploidizare, deoarece absorbţia în ultraviolet nu indică modificări în această perioadă. A doua zi se constată însă o creştere a concentraţiei de acizi nucleici. Este posibil ca mărimea iniţială a taliei să se datoreze sintezei proteice crescute. Stöcker (512) constată numai două clase de volume în ficatul normal, care apar mai puţin evidente în etapele tardive ale regenerării. Rezultate similare au fost relatate de Bucher şi Glinos (66). În observaţiile lor diametrul nuclear al ficatului în regenerare creşte de la $7{,}3 \pm 0{,}48$ la $9{,}0 \pm 0{,}59$ $\mu$ la 30 de ore după îndepărtarea a 68% din ficat. Creşteri volumetrice nucleare asemănătoare într-o perioadă la fel de scurtă au fost observate de Rather (438) în ficatul şobolanilor trataţi cu tioacetamidă. Acest compus utilizat în combaterea unei micoze a portocalelor determină în doze mari necroză centrală hepatică şi în doze mici, ciroză hepatică la şobolan. O doză intermediară (0,032 g/100 g) induce o fibroză difuză cu noduli mici, creştere marcantă în greutate, proliferare biliară şi creşterea nucleilor şi a nucleolilor. La animalele de control, curba cariometrică este trimodală la 125, 250 şi 500 $\mu^3$, dar majoritatea nucleilor sînt situaţi în clasa volumetrică de mijloc.

La două zile după introducerea dietei cu tioacetamidă în concentraţie de 0,032 g/100 g, volumul mediu nuclear se dublează şi prodomină nucleii mari. Citoplasma devine oxifilă. Creşterea enormă a nucleului şi pierderea bazofiliei din citoplasmă sugerează că ribonucleoproteina este deplasată din citoplasmă în nucleu. Cercetările lui Heizer (240) au evidenţiat faptul că sporirea de volum nucleară nu se însoţeşte de creşterea ADN. În cariometria hepatică un aspect îndelung discutat a fost relaţia dintre volumul nuclear şi conţinutul în ADN. În figura 48 sînt reprezentate volumele nucleare şi masa de ADN pentru 100 de nuclei hepatici. Frecvenţele relative ale valorilor măsurate sînt reprezentate ca histograme dedesubt şi alături de axe. Din grafic reiese atît o dublă ritmicitate pentru volume şi conţinutul lor în ADN, cît şi corelaţia celor două valori. Ecuaţia de regresiune la un coeficient de corelaţie de 0,85 se exprimă prin dreapta:

$$M = (0{,}026\ Vcm^{-3} + 2{,}84)\ 10^{-12}\ g$$

trasată prin norul de puncte. De remarcat că dreapta, a cărei pantă este expresia corelării menţionate, nu trece prin originea coordonatelor, ci intersectează ordonata la valori pozitive ale ADN.

Heiberg (234) care a realizat primul studiu de distribuţie de frecvenţă a nucleilor hepatocitelor constată o creştere a volumului nuclear paralelă cu vîrsta. La om, Ashworth şi Reid (19) descriu nuclei mari, nucleoli proeminenţi şi incluzii eozinofile mai frecvent la subiecţii bătrîni.

Influenţa hormonului somatotrop la şoarecii normali şi pitici asupra ficatului a fost urmărită de Helweg-Larsen (244). De la naştere pînă la

Scanned with OKEN Scanner

vîrsta de două săptămîni creşterea ficatului are loc prin diviziune celulară. Ulterior, numărul celulelor rămîne constant, iar creşterea volumului nuclear şi celular este proporţională cu logaritmul greutăţii hepatice. Apariţia claselor nucleare are loc în săptămîna a 3-a şi este dependentă de hormonul somatotrop. Odată cu prezenţa claselor nucleare cu ploidie variată, se constată şi o creştere proporţională a ADN care însoţeşte mărirea volumelor. Hipofizectomia inhibă apariţia celulelor tetraploide şi deprimă activitatea mitotică (137).

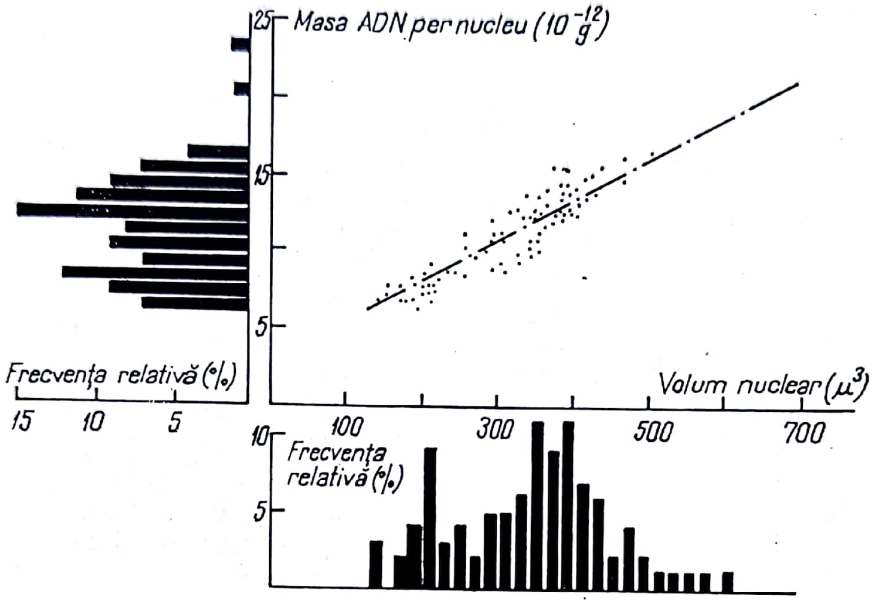



Fig. 48. — Corelaţia dintre volumul nuclear şi masa de ADN în nucleii hepatici.

Efectul aportului de proteine a fost investigat de Ely şi Ross (159) la şobolanii alimentaţi fără proteine sau cu regimuri conţinînd 12 şi 26% proteine. Nucleii hepatici de la şobolanii cu dietă fără proteine se colorează mai intens cu metoda Feulgen. Volumul mediu al nucleilor hepatici de la şobolanii fără proteine şi cu dietă conţinînd 12 şi 26% proteine este respectiv de 372, 474 şi 572 $\mu^3$. Cantitatea de ADN pentru aceleaşi raţii de proteine este respectiv de $1{,}20 \times 10^{-8}$ mg, $1{,}17 \times 10^{-8}$ mg şi $1{,}02 \times 10^{-8}$ mg, ceea ce înseamnă că, deşi nucleii proveniţi de la şobolanii hrăniţi cu 26% proteine au volumul cel mai mare, conţin cea mai scăzută cantitate de ADN. Lecomte şi de Smul (333), cercetînd aceeaşi problemă, găsesc cantităţi de ADN per nucleu hepatic (măsurat în unităţi arbitrare) de $582{,}4 \pm 5{,}2$, $603{,}9 \pm 5{,}7$ şi $638{,}6 \pm 4{,}7$ pentru diete cu 19, 10 şi 3,2% conţinut proteic respectiv.

Urmărind modificările ADN în nucleii hepatocitelor la embrionul de şobolan în comparaţie cu adultul, Bibbiani şi Tongiani (42) constată un conţinut în ADN cu 35—40% mai mic ($4{,}6 \times 10^{-12}$ g) în nucleii diploizi embrionari faţă de şobolanul adult ($7{,}7 \times 10^{-12}$ g). Aceasta este cu atît mai interesant, cu cît nucleii hepatici ai embrionului posedă o masă uscată, corespunzînd nucleilor diploizi de la adult. Cantitatea de ADN creşte imediat după naştere şi atinge valorile de la animalul adult în pri-

mele 6 zile de viaţă. Creşterea ADN per nucleu se datoreşte sintezei *de novo*, aşa cum reiese şi din încorporarea $^3$H-timidinei (547), (548). Creşterea conţinutului în ADN fără o variaţie concomitentă a numărului de cromozomi este în contradicţie cu ideea constanţei ADN raportată la setul cromozomial. O explicaţie poate fi oferită de observaţia lui Biesele (45), care constatase de mult o creştere a mărimii cromozomilor în metafază în trecerea de la embrion la adult.

### *Efectul substanţelor toxice asupra nucleilor hepatocitari*

Un mare număr de substanţe toxice produc alteraţii ale celulei hepatice şi determină deplasarea traseelor cariometrice. Podofilina şi colchicina produc o dextrodeviere, în timp ce azotul muştar atrage o levodeviere a cariogramei. O creştere marcantă a nucleilor hepatocitari la şobolan a fost observată la 2 ore după injectarea de aloxan (265), precum şi după administrarea de 2,3-diaminofenazin (367). Stowell şi Lee (514) au cercetat modificările citologice hepatice apărute la 2, 5 şi 12 ore, precum şi între 1 şi 18 zile, la şobolanul tratat cu $CCl_4$ per os. Primele modificări apărute la 5 ore constau în pierderea bazofiliei citoplasmatice. În a 3-a zi volumul nuclear întrece cu 66% nucleii hepatici martor, iar la 12 zile persistă o sporire de 20%. Hoffman (273) observă modificări ale gradului de ploidie în ficatul şobolanilor intoxicaţi cu o singură doză de $CCl_4$. Deşi după 120 de ore aspectele histologice sînt complet revenite la normal, procentajul crescut al nucleilor poliploizi se menţine pînă la a 8-a săptămînă. Apariţia poliploidiei şi sinteza acizilor nucleici sînt inhibate la şobolanii trataţi cu cortizon şi $CCl_4$. Post şi Hoffman (426), (427) constată că tratamentul combinat hormon somatotrop şi $CCl_4$ scade necroza hepatică şi accentuează regenerarea, ADN este sintetizat în cantitate mai mare, iar poliploidia apare mai evidentă decît la şobolanii trataţi exclusiv cu $CCl_4$.

Administrarea orală a insecticidului clordan la şobolani induce mărirea hepatocitelor, a nucleilor şi nucleolilor cu aproximativ 40% faţă de normal (10). Într-un studiu amplu privind modificările nucleilor hepatocitari *in vitro*, Demuth (124) stabileşte că acidul clorhidric, clorura de aluminiu şi clorura de magneziu provoacă diminuarea volumului nuclear, pe cînd hidroxidul de sodiu şi fosfatul monosodic atrag creşterea nucleilor. Dihidroratenona, produs de oxidare a ratenonei, substanţă cu structură chimică apropiată de DDT, atrage scăderea nucleilor hepatocitari (10). Estrogenii cresc numărul celulelor binucleate, în timp ce castrarea reduce procentajul acestora.

## Morfopatologia hepatică cantitativă

### *Hepatita epidemică*

Am constatat un paralelism strîns între traseele cario- şi intercariometrice şi forma clinică a hepatitei epidemice. În forma uşoară volumele nucleare medii oscilează între 126 şi 155 $\mu^3$, în forma medie se găsesc valori

Scanned with OKEN Scanner

de la 129 la 338 $\mu^3$, iar în forma gravă cu comă hepatică, volumul nuclear mediu oscilează între 118 și 320 $\mu^3$ (104 ), (105).

La bolnavii cu hepatită epidemică urmăriți prin puncții hepatice succesive, Tașcă, Enăchescu și Crăciun (528) au remarcat aspecte consenzuale între tabloul anatomic și cel cantitativ. Traseele plurimodale, indicînd o populație celulară neomogenă la 8 (fig. 49 și 50) și 50 de zile

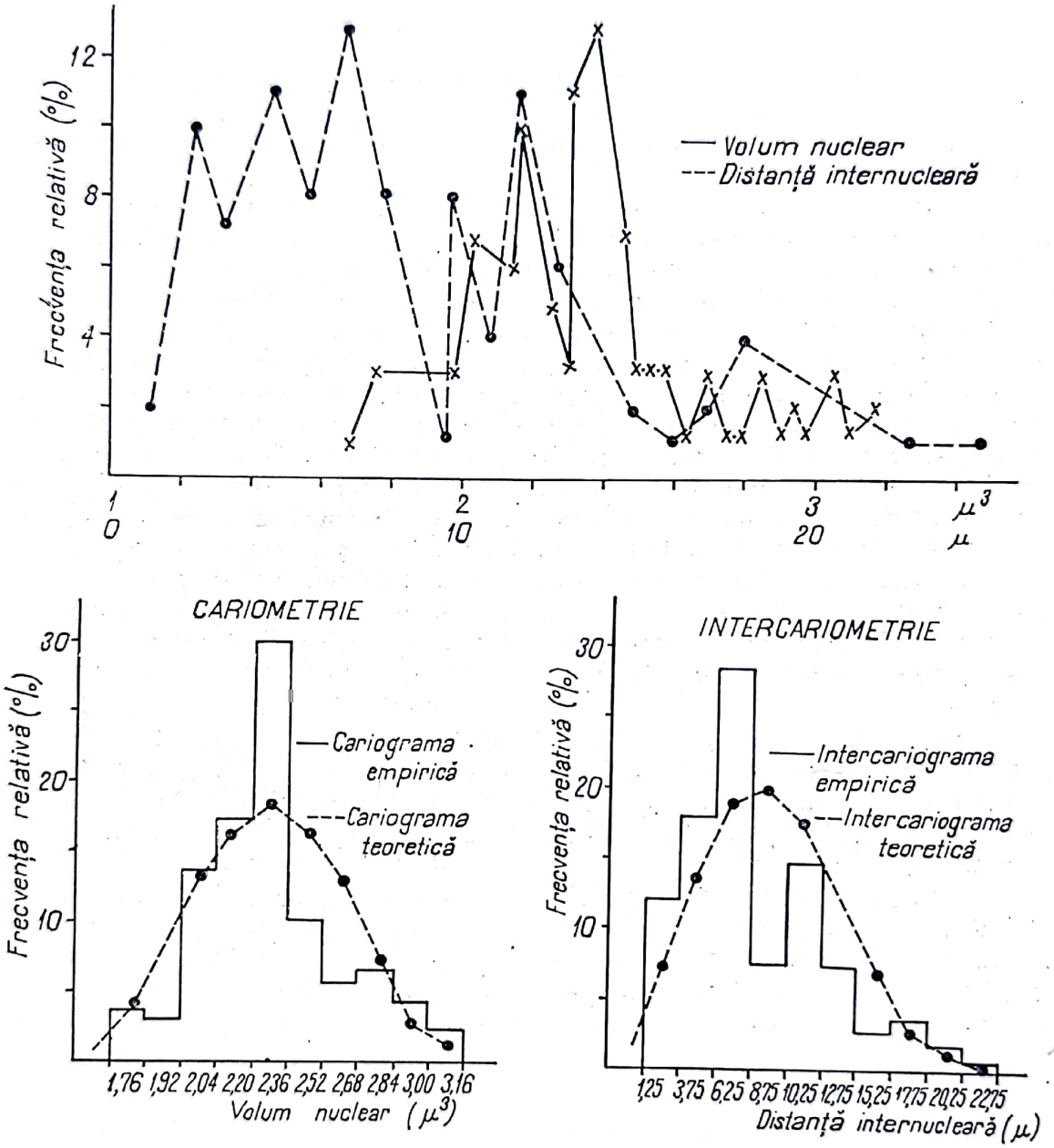



Fig. 49. — Curbele cario-intercariometrică empirică și teoretică: puncție hepatică în a 8-a zi de hepatită epidemică.

(fig. 51 și 52), sînt înlocuite de o curbă mai puțin accidentată la 180 de zile (fig. 53 și 54). Concomitent volumul mediu ($\bar{x}$) scade de la $\bar{x}_{8\ zile}=240\mu^3$ la $\bar{x}_{50\ de\ zile}=182\ \mu^3$ și, în sfîrșit, la $\bar{x}_{180\ de\ zile}=110\ \mu^3$. Distanța internucleară

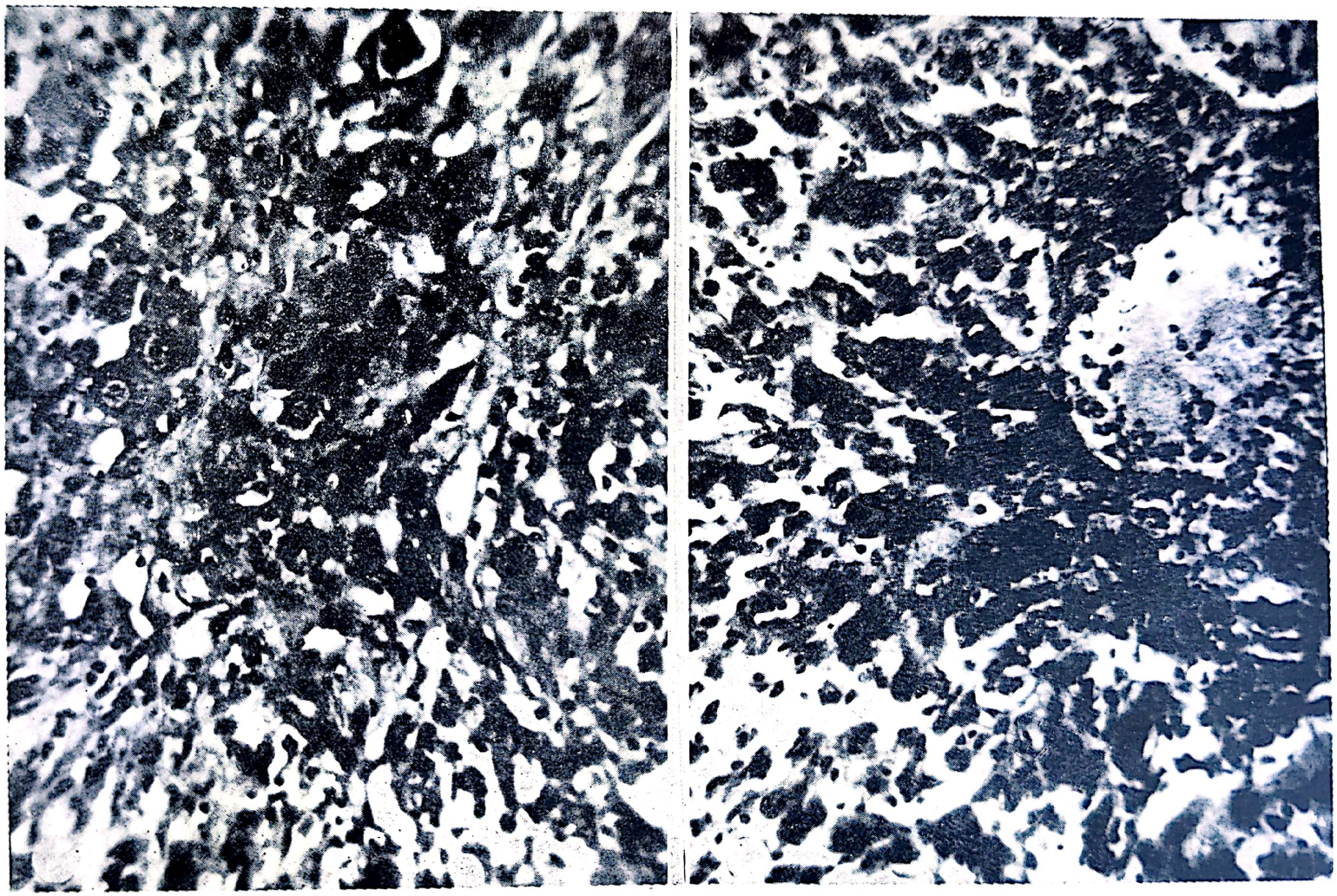


Fig. 50. — Puncţie hepatică în a 8-a zi de evoluţie a hepatitei epidemice. Anizocarie marcantă şi inflamaţie accentuată (col. HE; × 100).

Scanned with OKEN Scanner

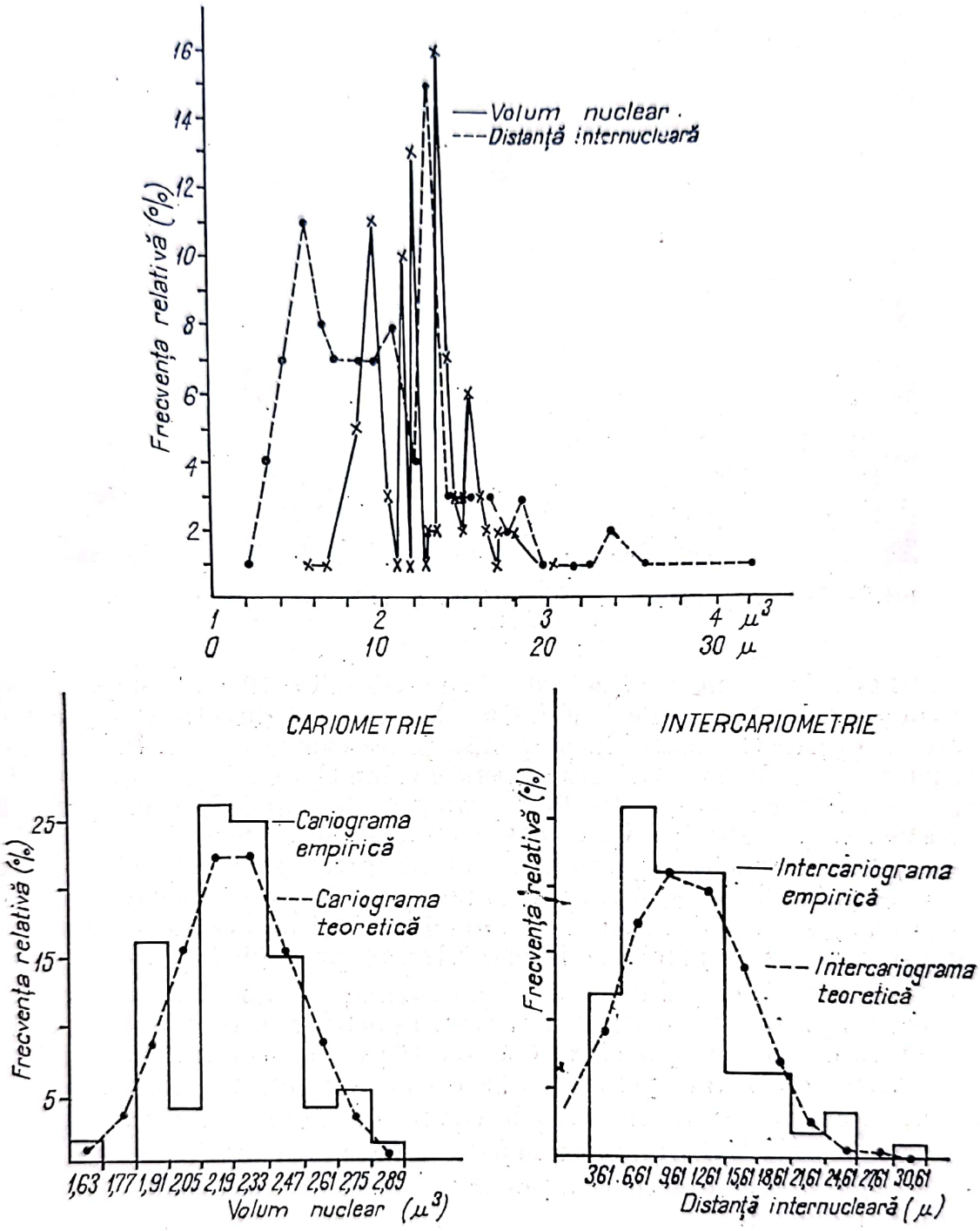



Fig. 51. — Cario-intercariogramele empirică și teoretică : puncție hepatică în a 50-a zi de evoluție a hepatitei epidemice.

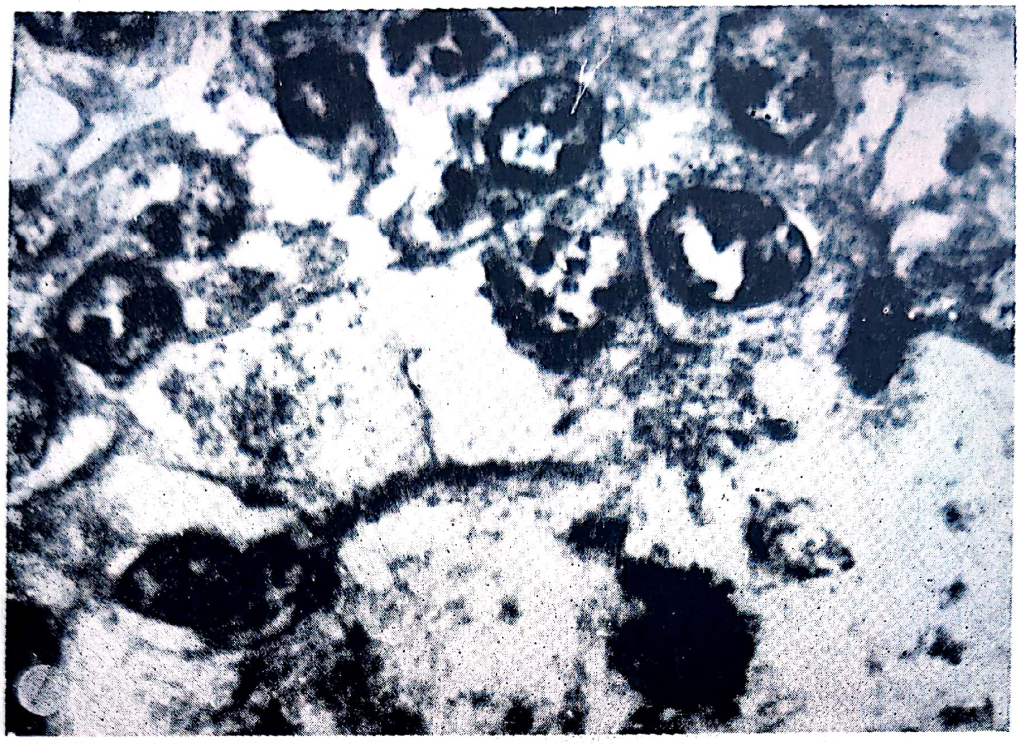


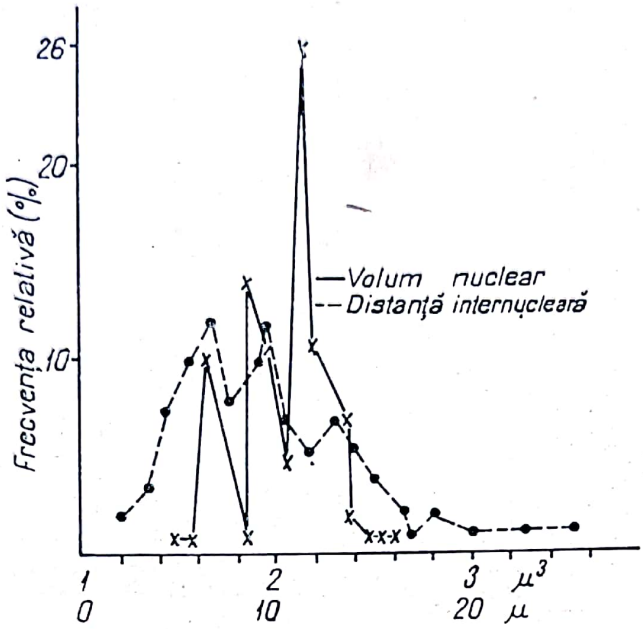
Fig. 52. — Leziuni distrofice şi anizocariocromie în hepatita epidemică în a 50-a zi de evoluţie.

($\bar{x}$) atinge valoarea maximă la 50 de zile : $\bar{x}_{50}$ de zile = 10 $\mu$, în comparaţie cu x 8 zile = 8 $\mu$ şi $\bar{x}$ 180 de zile = 9 $\mu$. Un rol în această direcţie este jucat de anizocitoză şi de vindecarea incompletă a proceselor distrofice. În raport cu timpul scurs se observă scăderea dispersiei volumelor nucleare : $\sigma_8 = \pm 0{,}35$; $\sigma_{50} = \pm 0{,}20$ ; $\sigma_{180} = \pm 0{,}18$. Corespunzător, se reduce şi coeficientul de variaţie : $CV_8 = 14\%$ ; $CV_{50} = 11\%$ ; $CV_{180} = 9\%$. Deviaţia standard a distanţelor internucleare prezintă o evoluţie oarecum inversă : $\sigma'_8 = \pm 5{,}1$ ; $\sigma'_{50} = \pm 5{,}4$ ; $\sigma'_{180} = \pm 4{,}2$. Concomitent scade şi coeficientul de variaţie : $CV'_8 = 63\%$; $CV'_{50} = 51\%$; $CV'_{180} = 46\%$. Există deci o tendinţă de reducere a dispersiei paralel cu intervalul dintre punctiile hepatice bioptice.

Cu excepţia etapei de 50 de zile, distribuţia volumelor nucleare este asimetrică, prezentînd o dextrodeviere cu coeficienţii de asimetrie corespunzători, care tinde spre zero : $C_8 = -0{,}16$ ; $C_{180} = -0{,}20$. O simetrie cu levodeviere se constată pentru curba distanţelor internucleare. Acest tip de corelaţie inversă între frecvenţele volumelor nucleare şi intervale pare a fi datorată evoluţiei favorabile a hepatitei în cazul analizat. Situaţia corespunde unei densităţi crescute a populaţiei hepatocitare aflată într-o bună condiţie biologică.

Aşa cum se ştie, curba normală empirică a volumelor nucleare hepatocitare este de tip mezokurtic ; măsurătorile efectuate prezintă un profil leptokurtic la 8 şi 180 de zile şi unul platikurtic la 50 de zile. Se pare că distribuţia valorilor este mai puţin dispersată la începutul şi la sfîrşitul bolii (528). Testul $\chi^2$ atestă că volumele şi distanţele internucleare prezintă tipul normal pentru intervalele investigate.

Scanned with OKEN Scanner



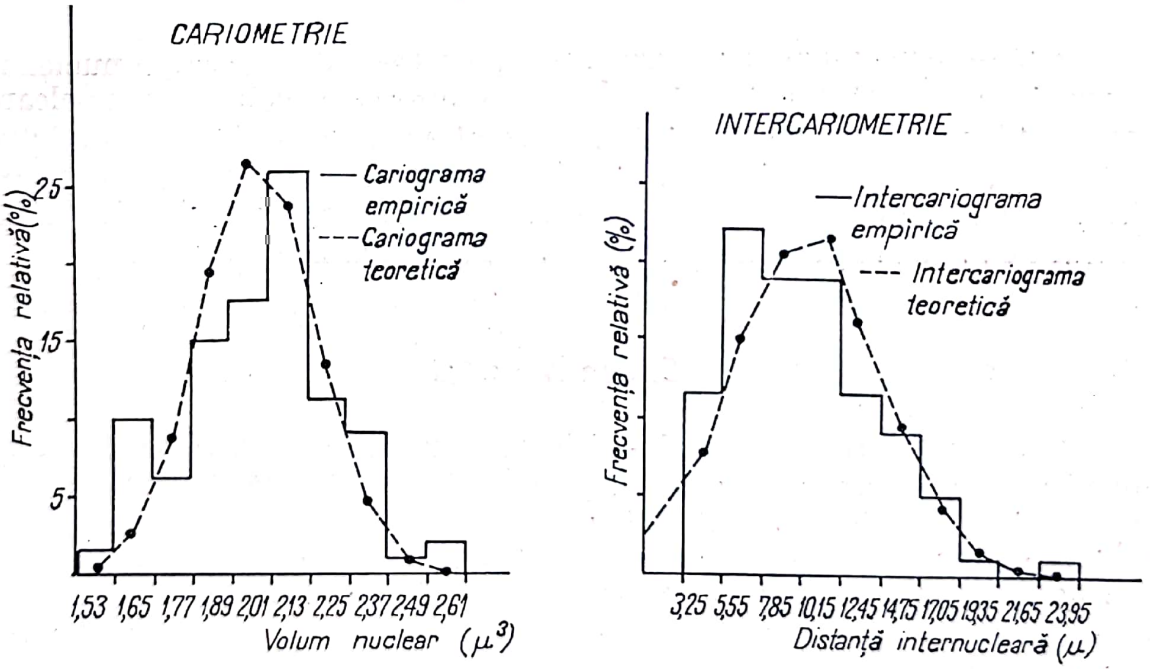




Fig. 53. — Cario-intercariogramele empirică și teoretică în a 180-a zi de evoluție a hepatitei epidemice.

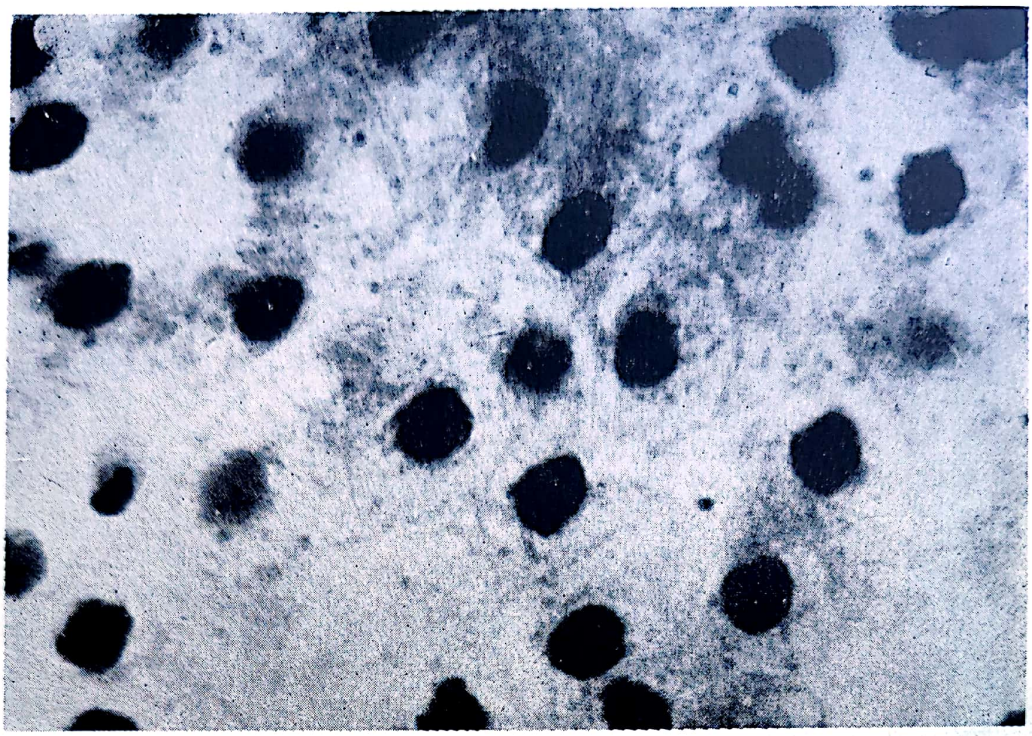


Fig. 54. — Hepatită epidemică în a 180-a zi de evoluţie cu persistenţa leziunilor distrofice citoplasmatice, dar cu nuclei egali ca formă şi colorabilitate.

Observaţiile lui Ranek (435) privind mărimea şi compoziţia nucleilor hepatici în hepatita epidemică confirmă creşterea volumelor nucleare necorelată cu cantitatea de ADN. Autorul constată însă corelaţii între volume, pe de o parte, şi cantitatea de proteine şi greutatea uscată, pe de altă parte. Aceste observaţii sugerează că mărirea volumetrică se află în legătură cu sinteza proteică mărită şi nu cu edemul intranuclear.

## *Ciroza hepatică*

Din analiza traseelor cario- şi intercariometrice în diverse tipuri de ciroză am remarcat unele aspecte patobiotice (106), (523), (524): anizocaria şi anizocariotopia sînt mai accentuate la gradele avansate de ciroză, cu inflamaţie şi regenerare intense. Volumul nuclear mediu creşte de la 140 $\mu^3$ în preciroze la 293 $\mu^3$ în ciroza cu colagenizare foarte marcantă. Se constată că nucleii situaţi la periferia teritoriilor de ciroză delimitate de benzi colagene sînt mai mari decît nucleii din centrul cîmpurilor hepatice, probabil în legătură cu inflamaţia şi regenerarea mai intense la periferie, dar şi cu tulburările hemodinamice. Se observă că la cirozele puţin avansate predomină clasele nucleare mici şi mijlocii pînă la 200 $\mu^3$, în timp ce în cirozele avansate apar clase nucleare mari, pînă la 2 000 $\mu^3$. Uneori anumite valori volumetrice pot lipsi, astfel încît curba ia un aspect neregulat, destrămat, cu mici accidente, întrerupte de platouri scurte.

Scanned with OKEN Scanner

# *Aparatul urinar*

## Rinichiul

Nucleii epiteliului renal sînt în majoritate diploizi, dar se găsesc şi nuclei tetraploizi sau octoploizi, al căror număr creşte în cursul regenerării sau după nefrectomie.

Datorită formei diferite a nucleilor în corpusculul renal şi în tubi, aceste formaţiuni trebuie tratate separat. În aprecierea volumelor renale, un rol important îl au variaţiile diurne şi sezoniere. Bucher (64) şi Kolb (310) constată în cursul a 24 de ore în tubii contorţi volume nucleare maxime la orele 10, 18 şi 22. Valori minime apar la orele 8, 14, 18. Iarna, valorile volumetrice sînt uşor crescute. Rezultatele cariometrice concordă cu observaţiile lui Niebroj (392), care constată volumul urinar maxim către ora 9 dimineaţa şi volumul minim spre ora 3 noaptea. Comparaţia cu valorile hormonului antidiuretic în sînge relevă o cantitate minimă de antidiuretină la ora 9 şi, dimpotrivă, valori maximale în cursul nopţii.

Corpusculul renal prezintă trei tipuri de structuri : epiteliul capsular, epiteliul glomerular şi celulele juxtaglomerulare.

Celulele din epiteliul parietal al capsulei Bowman au nuclei foarte alungiţi (E = 2,7) ; podocitele au nuclei mai mari şi mai rotunzi decît cei ai stratului extern al capsulei ; în complexul juxtaglomerular nucleii au o elongaţie relativ mare (E = 1,7). În sistemul tubular, nucleii sînt în general rotunzi (E = 1,15).

Fluctuaţii ale volumelor nucleare din tubi au fost descrise în modificări ale diurezei (13), (53), (64), (164), hipertrofie compensatorie după nefrectomie (150), (494), (515), (516), influenţe hormonale. Hipofizectomia şi suprarenalectomia scad volumul nuclear în tubii contorţi (138), (150), (289). Hormonul somatotrop, tiroxina şi androgenii atrag mărirea volumului nuclear (40), (289), (433), (543).

## Vezica urinară

Epiteliul vezicii urinare, de tip uroteliu, se pretează cu uşurinţă la determinări cantitative. Dealtfel încă din 1923, Stenius (508) a comunicat observaţii cu privire la cariometria papilomilor şi cancerelor vezicii urinare.

# *Aparatul genital*

## Ovarul

Interpretarea cariometrică a ovarului este foarte dificilă din cauza variaţiilor fiziologice pe care le suferă celulele.

*Ovocitul.* Mărimea nucleului ovulului depinde de etapa de maturaţie şi în general depăşeşte maximul care poate fi măsurat într-o secţiune

de grosime obişnuită. Ovulele foliculilor primari care nu au atins încă faza de creştere se pretează dimensionărilor nucleare. Nucleii acestora sînt uşor alungiţi sau sferoizi (E = 1,3—1,4).

Celulele epiteliale ale foliculului primar îşi schimbă forma în raport cu funcţia : la început turtite, devin treptat cuboidale şi cilindrice. Modificările nucleare urmează îndeaproape pe cele ale celulei ; elongaţia se reduce, volumul tinzînd să devină sferoid.

Celulele foliculare sînt dispuse în două straturi. Celulele foliculare externe au nuclei mici, cu elongaţie mare (E = 1,7). Nucleii celulelor foliculare interne sînt sferoizi (E = 1,3), uşor de măsurat.

Dintre celulele tecale, mai propice măsurătorilor sînt cele aparţinînd tecii interne, deşi forma nucleilor este alungită (E = 1,5—2,5) şi variază mult nu numai cu starea funcţională, ci şi cu diferenţele de orientare ale secţiunilor.

Teaca internă prezintă unele celule mari cu citoplasmă clară, dispuse în insule. Aceste celule interstiţiale prezintă o mare importanţă cariometrică, datorită reactivităţii în condiţii de stimulare hormonală. Mărimea nucleilor depinde de activitatea ICSH. După hipofizectomie volumul nuclear scade (176). Progesteronul atrage creşterea nucleilor din celulele interstiţiale (176), (297). Cantitatea de ADN ovocitar este în strînsă corelaţie cu influenţele hormonale exercitate de hipotalamus (142) şi hipofiză (548). Procese complexe de sinteze şi acumulări citoplasmatice au loc, după Mârza şi Araţei (360), în faza de „inerţie mitotică", ducînd la valori modulatorii ale ADN în nucleii ovocitelor, care descresc odată cu sporirea suprafeţei ovocitare.

În cariometria corpului galben trebuie diferenţiate două tipuri de de celule : luteinice, cu nuclei mari, uşor sferoidali (E = 1,3 — 1,4) şi paraluteinice, cu nuclei mai mici şi mai rotunzi (E = 1,4 — 1,5).

Determinările histofotometrice ale ADN coroborae cu dimensionările suprafeţelor nucleare în epiteliul unui chist folicular, precum şi în epiteliul corpului galben şi al corpului galben de sarcină indică următoarele valori (460) : numărul de celule tetraploide şi hipertetraploide apare cel mai crescut în corpul galben de sarcină. Cantitatea medie de ADN în celulele granuloasei, ale corpului galben şi ale corpului galben de sarcină este pentru nucleii diploizi de 48 unităţi arbitrare (UA) şi pentru nucleii tetraploizi de 96 UA (460). Suprafaţa nucleară a celulelor diploide şi tetraploide din cele trei structuri cercetate este în raportul 1 : 2 : 4. Din cercetările lui Sachs (460) rezultă o creştere importantă a nucleilor din corpul galben de sarcină. La un anumit număr din aceştia cantitatea de ADN rămîne însă constantă, ceea ce pledează pentru ideea lui Sandritter că macrocaria este asociată cu creşterea proteinelor nucleare şi nu a ADN. Se observă totuşi şi o creştere a ADN în sensul unei poliploidizări endomitotice. Atît edemul nuclear, cît şi poliploidia apar în suprasolicitarea celulelor granuloasei, în special în sarcină, cînd

Scanned with OKEN Scanner

se formează o cantitate mare de progesteron. Dealtfel Sobotta în 1896 considera formarea corpului galben urmarea unui proces strict hipertrofic ; Dubner (144) nu găseşte nici o mitoză în celulele granuloasei corpului galben de sarcină.

## Trompa

Mărimea nucleilor din epiteliul tubar depinde de ciclul ovarian. Este necesar să se ţină seama de planul de orientare a secţiunilor, deoarece nucleii au formă ovoidă, cu o elongaţie de peste 1,5. Se recomandă secţiuni perpendiculare pe axul lung al trompei. Epiteliul tubar este foarte sensibil la estrogeni. După administrarea de 50 $\gamma$ estradiol la şobolance impubere, volumul nuclear al epiteliului tubar creşte de trei ori (412).

## Uterul

Din punct de vedere cantitativ este necesară tratarea separată a corpului şi colului uterin.

*Corpul uterin*. Celule epiteliale ale uterului în repaus sînt cuboidale sau cilindrice, cu nuclei ovoizi (E = 1,25). Variaţii volumetrice considerabile apar după tratamentul cu estrogeni.

Tunica proprie a mucoasei, mai puţin uniformă din punct de vedere cariometric decît epiteliul, prezintă volume nucleare între 30 şi 350 $\mu^3$, cu o elongaţie de la 1,05 la 1,7. Determinările cariometrice în miometru sînt dificile datorită formei nucleilor. Colul uterin prezintă nuclei mai mici şi mai alungiţi decît în epiteliul corpului uterin.

Studiile cariometrice la nivelul uterului au avut ca obiectiv demonstrarea modificărilor din sarcină (184) sau titrarea biologică a estrogenilor (198), (270). Cantităţi extrem de mici de progesteron, de ordinul a 0,0002 $\mu$g, determină hipertrofia nucleilor şi nucleolilor la nivelul endometrului de şoarece (testul Hooker şi Forbes) (275). La naştere apare o creştere remarcabilă a volumelor nucleare în endometru, ca semn al activităţii celulare. O hipertrofie nucleară ceva mai redusă se constată şi în prepubertate (535).

Urmărind corelaţiile dintre ADN şi volumele nucleare sub acţiunea estrogenilor, Alfert şi Bern (3) constată o creştere marcantă a volumului nuclear, însă nici o modificare a cantităţii de ADN ; rezultă deci că este vorba de o hipertrofie nucleară funcţională fără duplicarea numărului de cromozomi. După Gorski şi colab. (210), Potter (428), Williams-Ashman (564), steroizii cresc sinteza acizilor nucleici şi proteinelor. Estrogenii măresc numărul de mitoze, în timp ce gestagenele inhibă mitozele. Reacţia endometrială la progesteron se traduce printr-o creştere semnificativă

Scanned with OKEN Scanner

(20%) a ADN în nuclei. Estradiolul determină o creştere mai redusă (11%) a sintezei ADN. Doze mari de testosteron nu modifică sinteza ADN în nucleii stromali (337). Endometrul atrofic, ca şi endometrul din faza de secreţie au în 90—92% din cazuri un conţinut diploid în ADN.

## Placenta

Nucleii placentari diferă ca formă şi mărime în funcţie de fazele sarcinii. Nucleii sinciţiotrofoblastului sînt ovoizi (E = 1,4), de mărime uniformă; celulele citotrofoblastice au nuclei alungiţi, inegali ca formă şi mărime. În celulele sinciţiale ale vilozităţilor coriale nucleii prezintă în 97% din cazuri un conţinut ADN diploid. În graviditate activitatea celulară din endometru şi trofoblast creşte considerabil. Sachs (460) observă o sporire marcantă a ADN în celulele deciduale din vilozităţile coriale, în celulele sinciţiale, în glandele endometrului şi în celulele gigante fetale. Intervine aici desigur poliploidizarea prin endo - şi amitoză. Concomitent se constată o macrocarie apreciabilă în celulele deciduale în cursul sarcinii. Este important de semnalat că mărirea nucleilor din celulele deciduale în cursul primelor luni de sarcină este datorată hipertrofiei de lucru; în celulele vilozităţiilor coriale, ca şi în elementele deciduale din bazala placentară, macrocaria este însoţită de creşterea cantităţii de ADN (452), (460).

## Glanda mamară

Nucleii mamari sînt alungiţi (E = 1,4), în general uniformi, dînd o curbă de tip Gauss. Modificări volumetrice apar în cursul sarcinii (152), (263), (418) după administrare de estrogeni.

## Testiculul

Studiile cariometrice pe testicul includ măsurători ale celulelor implicate în spermatogeneză şi ale elementelor Leydig.

Spermatozoizii au făcut obiectul a numeroase studii legate de fertilitate sau ca referinţă la valorile haploide ale ADN (26), (204). Conţinutul în ADN al spermatozoizilor la diferite specii, în comparaţie cu celulele diploide, este redat în tabelul nr. 24.

În cercetări minuţioase, Bahr şi Wied (26) constată următoarele valori pentru spermatozoizii de taur, exprimate în unităţi arbitrare (tabelul nr. 25):

Scanned with OKEN Scanner

*Tabelul nr. 24*

**Conținutul în ADN al nucleilor haploizi și diploizi. Comparație între valorile obținute în lumină ultravioletă și determinări biochimice (după Sandritter (467))**

| Specia | Spermatozoizi ADN × $10^{-12}$ g | | Celule diploide ADN × $10^{-12}$ g | |
|---|---|---|---|---|
| | UV | chimic | UV | chimic |
| Om | 3,12 | 2,7 | 6,8 | 6,8 |
| Taur | 3,24 | 3,2 | 6,5 | 6,4 |
| Iepure | 3,24 | 3,1 | 5,7 | 5,3--7,2 |

*Tabelul nr. 25*

**Valorile ADN și ARN în spermatozoizii de taur (rezultate exprimate în unități arbitrare) (după Bahr și Wied (26))**

| Tipul de reacție histochimică | Unități arbitrare |
|---|---|
| Hidroliză—HCl, Schif | |
| pH 1,5 | 4,31 |
| pH 2,5 | 4,15 |
| Hidroliză—TCA | 3,65 |
| HCl—Feulgen | |
| Fluorescență | |
| 6N HCl | 65,6 |
| 1N HCl | 156,5 |
| Galocianină | 3,65 |
| Fast-green | 3,40 |

Merkle (372) a identificat 6 faze ale spermatogenezei cu caracteristici cariometrice proprii. Cea mai convenabilă bază pentru studiul spermatogenezei este clasificarea stadială a lui Roosen-Runge și Barlow (453). Autorii subdivid fiecare ciclu al procesului continuu și periodic de maturație în 8 faze Roosen-Barlow (RB), calculînd durata relativă pentru fiecare fază. În fiecare din cele 8 faze sînt determinate separat volumele medii ale spermatogoniilor (tip A, intermediar și B), ale spermatocitelor (primare și secundare), ale spermatidelor și ale celulelor Sertoli. Volumul nuclear al spermatogoniilor A este practic constant în fazele $RB_{1-3}$. În faza $RB_4$ volumul nuclear crește cu 40%. În faza $RB_5$ apar spermatogoniile intermediare, ai căror nuclei au volume cu 75—80% mai mari decît ai spermatogoniilor de tip A. În faza $RB_6$ spermatogoniile intermediare trec în spermatogonii de tip B cu nuclei dubli față de spermatogoniile A.

Nucleii spermatocitelor primare, formați în faza $RB_7$, sînt mai mici decît ai spermatogoniilor B, ei începînd să crească abia în faza a 4-a a ciclului următor. Modificările nucleare ale spermatocitelor primare sînt la început reduse, iar creșterea rapidă începe cînd spermatocitele fazei următoare sînt deja prezente, adică atunci cînd se poate vorbi de spermatocite secundare. În faza $RB_8$ nucleii sînt mai mari cu 170% decît nucleii spermatocitelor primare din aceeași fază. Nucleii spermatidelor sînt aproape rotunzi; volumul lor este de 120 $\mu^3$.

Celulele Sertoli prezintă două perioade de creștere nucleară în cursul unui ciclu: prima perioadă în fazele $RB_2$ și $RB_3$, iar a doua în faza $RB_6$. Creșterea de volum poate atinge 40%. S-au demonstrat corelații între volumul nuclear al celulelor Leydig și producția lor de androgeni. În hiperproducția de androgeni, nucleul celulelor Leyding crește; o diminuare se observă în criptorhidie. Hipofizectomia atrage diminuarea volumului celulelor Leydig, scădere care poate fi blocată prin gonadotropină corionică. Administrarea de gonadotropină corionică atrage la om o creștere semnificativă a nucleului și citoplasmei celulelor Leydig fără a influența numărul lor (242).

Scanned with OKEN Scanner

## *Glandele endocrine*

În morfologia cantitativă a țesuturilor endocrine un rol important îl au factorii fiziologici care pot influența considerabil rezultatele. Printre aceștia menționăm vîrsta, sexul, fluctuațiile diurne și sezoniere, stressul.

### Hipofiza

Jacobj (284) a efectuat studii cariometrice pe hipofiza umană, fără însă a ține seama de tipurile celulare, în baza ideii că toate celulele sînt variante diferențiate ale aceluiași tip. Floderus (179), respingînd ideea unității de origine a celulelor hipofizare, constată următoarele valori ale diametrelor nucleare : celulele de sarcină au nuclei de 6,8—8,3 μ (x = 7,3 μ), cromofobele au de la 5,9 la 6,1 μ (x = 6,0 μ), acidofilele au de la 4,6 la 5,3 μ (x = 5,0 μ). O creștere remarcabilă a bazofilelor se observă după tratament îndelungat cu ACTH (303). Nucleii elementelor eozinofile prezintă de asemenea o creștere în primele săptămîni de tratament cu ACTH, dar revin la normal după aproximativ 3 luni. Mârza și colab. au urmărit în studii ample morfologia cantitativă a hipofizei, demonstrînd un comportament variat al celulelor acestei glande, corelat cu diferite condiții imunologice.

### Epifiza

Se cunosc foarte puține date cariometrice privind corelarea dintre funcția și volumul nucleilor epifizari. În cercetări *in vitro* am constatat că nucleii pinealocitelor de șoboln își măresc volumul odată cu o ușoară creștere a cantității de ADN sub acțiunea tiroxinei adăugată la mediul de cultură (529), (533). Concomitent, crește semnificativ indicele de marcare cu $^3$H-timidină (fig. 55).

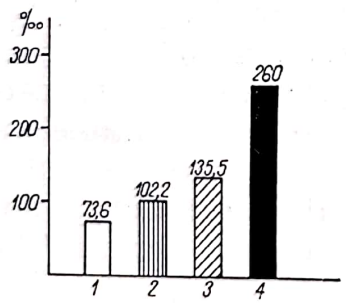



Fig. 55. — Creșterea indicelui de marcare cu $^3$H-timidină sub acțiunea tiroxinei adăugată la culturile de pineală. *1*, Epifiză martor; *2*, epifiză tratată cu 5 γ/ml tiroxină; *3*, epifiză tratată cu 25 γ/ml tiroxină; *4*, epifiză tratată cu 50 γ/ml tiroxină.

### Suprarenala

*Corticosuprarenala.* Nucleii din zona glomerulară au o formă în general alungită; în zona fasiculată, forma nucleilor tinde să se rotunjească (E = 1,5).

Diferențele legate de sex sînt destul de mari : nucleii din zona glomerulară sînt cu 6% mai mici la femele decît la masculi. Un rol important în modificările mărimii nucleare îl au variațiile sezoniere și vîrsta. Silvestroni (499) constată în

fasiculata suprarenalei la om volume nucleare de 800 $\mu^3$ la făt, care scad la 240 $\mu^3$ la 1 an, cresc din nou la 390 $\mu^3$ la 8 ani, se menţin la aceste valori toată perioada adultă, pentru ca să scadă foarte lent după 40 de ani. Hipofizectomia determină la şobolan o scădere a nucleilor din fasciculată.

La şobolanii hipertensivi prin nefrectomie şi plasarea unei ligaturi în jurul pedicului rinichiului restant, Rather (439) constată creşterea nucleilor şi nucleolilor din zona fasciculată. Rezultate similare au fost comunicate de Creutzfeld şi colab. (108) în suprarenala şobolanilor supuşi la înot.

În raport cu anotimpul se observă că în februarie vîrful modal al nucleilor din fasciculata suprarenalei de şobolan este la 141 $\mu^3$; în iulie se deplasează la 200 $\mu^3$, dar scade la 168 $\mu^3$ în octombrie. Un ritm circadian şi circanual al ARN a fost descris în literatură (391). Administrarea de ACTH determină chiar după 30 min o creştere a nucleilor din fasciculată; efectul este maximal la 1—2 ore, apoi volumele revin treptat la normal. Odată cu creşterea nucleilor sporeşte şi conţinutul în corticoizi.

Administrarea de stilbestrol şi testosteron determină o creştere marcantă a volumelor în fasciculată şi reticulată, concomitent cu o sporire a activităţii enzimatice a $NADH_2$-tetrazolium-reductazei (376).

Volumele nucleare din zona glomerulară variază în funcţie de producţia de mineralocorticoizi. DOCA, inhibînd producţia mineralocorticoizilor endogeni, tinde să scadă volumele nucleare (379). Deshidratarea creşte volumele nucleare din glomerulară, dar după 2 luni de tratament cu soluţie salină volumele scad în zona glomerulară, pentru a creşte în zona fasciculată.

Stressul atrage modificări nucleare în zonele fasciculată şi glomerulară. O creştere semnificativă a nucleilor a fost observată experimental după injectare de formol (168), (361), (506), ca rezultat al stressului prin imobilizare (539) sau prin expunere la frig (221), (548). Experienţele lui Fülöp (186) indică o creştere a volumelor nucleare din fasciculată consecutivă leziunilor din tuber cinereum. Leziunile din eminenţa mediană atrag o scădere a volumelor nucleare în zona fasciculată (46).

Numeroase date din literatură menţionează modificări ale volumelor nucleare din zonele fasciculată şi reticulată consecutive modificărilor funcţiei tiroidiene (151), (167), (481), (482).

*Medulosuprarenala* prezintă un traseu cariometric diferenţiat corelat cu starea funcţională. La şobolanul normal, frecvenţa maximă a volumelor nucleare apare la 144 $\mu^3$ (438). Hipertensiunea experimentală şi regimurile bogate în sare atrag creşterea volumelor nucleare; antidiabeticele şi insulina favorizează reducerea nucleilor. Expunerea la frig atrage o diminuare a ADN în nucleii medulosuprarenali (538). După alţi autori (16), (92) frigul nu determină nici o modificare a ADN în medulosuprarenală.

## Tiroida

Jacobj (288) constată pentru tiroida umană un traseu cariometric bimodal cu maximele la 151 şi 310 $\mu^3$. Celulele parafoliculare (C) au un

volum relativ de 0,80—0,70% faţă de numărul total de celule epiteliale (197), (296).

În observaţii nepublicate, efectuate pe aproximativ 14 000 de celule C, am constatat că numărul acestora variază în funcţie de tireopatia investigată. Astfel densitatea celulelor C raportată la cîmpul microscopic de 95,3 $\mu^3$ este maximă în tiroidita cronică (19 celule C) şi minimă în boala lui Basedow (8 celule C). Volumul maxim al celulelor parafoliculare apare în boala lui Basedow (536 $\pm$ 37 $\mu^3$). Valoarea minimă a volumului celulelor C a fost constatată în guşa anizofoliculară (369 $\pm$ 22 $\mu^3$).

În cercetări pe material uman şi experimental, Săhleanu (477), (478), (479), (480) observă că omogenitatea dimensională a nucleilor variază cu starea funcţională a tiroidei. Normotiroidia se caracterizează printr-un traseu cariometric în clopot, unimodal. În hiperfuncţie, curba se turteşte odată cu apariţia de vîrfuri secundare la 1,5 şi 2 V.

Folosind o latice cu 36 de puncte, Skultety (498) constată în tiroida de şobolan cantităţile cele mai mari de coloid în foliculii periferici. Se remarcă de asemenea o cantitate mare de coloid raportată la o singură celulă epitelială. Modificarea relaţiilor dintre epiteliu şi masele de coloid apare mai pregnantă în centrii activi ai tiroidei.

Aspectele morfologice cantitative sînt utile în determinarea acţiunii metiltiouracilului, administrat în experiment atît acut, cît şi cronic (412). În cursul experimentului acut se observă că epiteliul folicular creşte chiar după prima oră cu 20%, iar în următoarele 5 ore cu 70%. Celulele parafoliculare rămîn nemodificate. Diametrul acinilor scade cu 20% în primele 7 ore, dar revine ulterior la valoarea iniţială. Mai pregnante apar modificările cantitative în cursul tratamentului cronic cu metiltiouracil. Înălţimea epiteliului creşte din prima zi a experimentului. Creşterea atinge maximul la 7 zile. Celulele parafoliculare încep să se înmulţească la 6 zile de la începerea tratamentului, iar după 20 de zile creşterea numerică depăşeşte 200%. Diametrul acinilor scade în a 2-a zi de tratament, apoi creşte uşor. Volumul acinilor prezintă o creştere de 250% în a 15-a zi de tratament. Volumul nucleilor epiteliali înregistrează o creştere de 30% în a 6-a zi şi de 40—70% mai tîrziu. Dintre determinările efectuate, cea mai sensibilă structură la metiltiouracil pare să fie volumul acinilor (412).

În 1941, Milcu (378) propune dinamica modificărilor dimensionale ale celulelor foliculare ca metodă de investigare a activităţii epiteliului tiroidian sub acţiunea hormonului tireotrop, anticipînd cu 15 ani tehnica lui Mess (375), care în 1956 publică observaţii privind titrarea TSH prin măsurători cariometrice în tiroida puilor de găină de o zi. Efectul TSH tradus prin creşterea volumului nuclear apare chiar la 15 min după administrare şi atinge maximul la două ore (307). Acţiunea tiouracilului, bazată în esenţă pe mobilizarea TSH, atrage de asemenea sporirea dimensiunilor nucleare (348), (375).

După hipofizectomie, datorită nivelului scăzut al TSH, volumele nucleare se reduc. Administrarea de TSH restaurează volumele nucleare la şobolanii hipofizectomizaţi.

Administrarea de tiroxină inhibă producţia de TSH, urmată de scăderea volumelor nucleare. O creştere semnificativă, rapid instalată, a volumelcr nucleare apare după expunerea la frig. Ovarectomia atrage diminuarea volumelor nucleare, care se poate corecta prin stilbestrol

Scanned with OKEN Scanner

(166). La întrebarea ce acţiune au estrogenii asupra tiroidei, răspunsurile sînt cu totul diferite: Franck (183), Gardner (192), Heyl şi colab. (264), Müller şi Aeppli (387) atribuie estrogenilor un rol inhibitor, în timp ce Desclain şi Ermans (127), Palkovits şi colab. (412) constată stimularea funcţiei tiroidiene sub acţiunea estrogenilor.

În observaţii personale (107), (523), (525) am constatat modificări ale nucleilor tireocitelor în funcţie de natura tireopatiei : de la 60 la 75 $\mu^3$ în gușile anizofoliculare (fig. 56), nucleii cresc la 200 $\mu^3$ în boala lui Basedow și la 200—300 $\mu^3$ în diverse forme de cancer tiroidian (fig. 57).

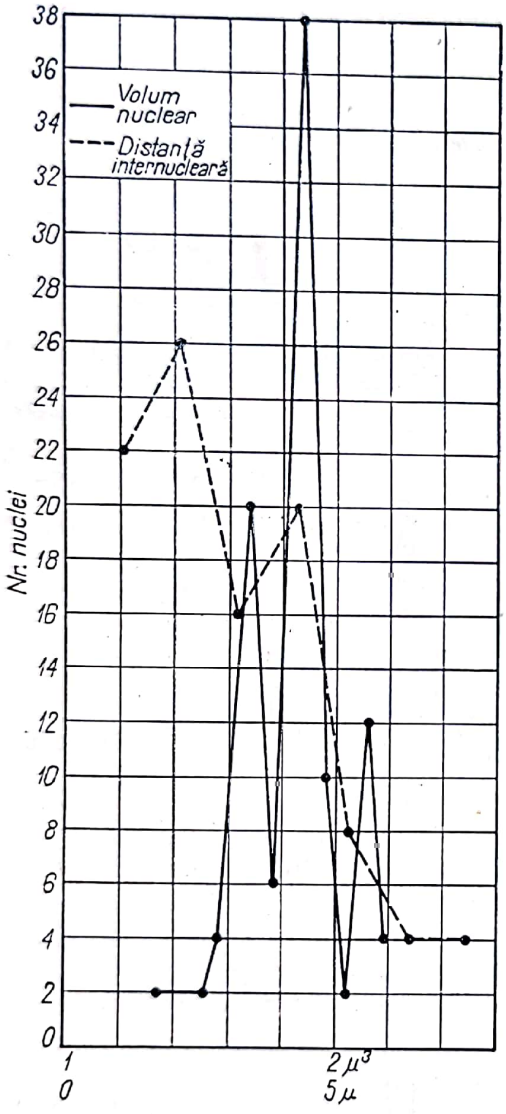



Fig. 56. — Cario-intercariograma gușii anizofoliculare.

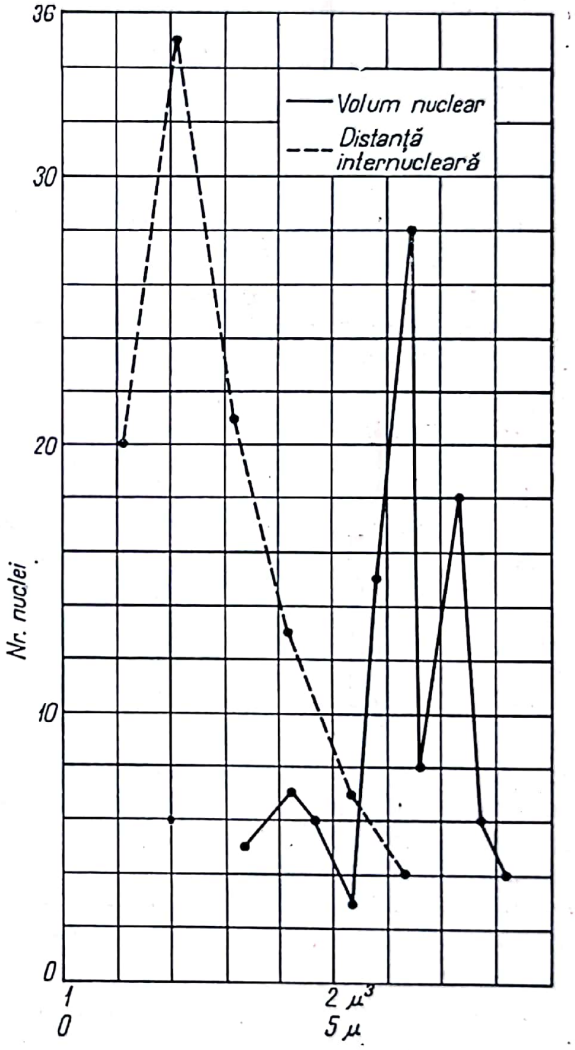



Fig. 57. — Cario-intercariograma adenocarcinomului tiroidian.

În culturi de tiroidă, provenite de la bolnavi cu diverse afecţiuni ale glandei tiroide, am efectuat dozarea citofotometrică a ADN. În raport cu tireopatia investigată se observă predominanţa valorilor diploide în guşa polinodulară, adenomul embriofetal și adenomul anizofolicular. În boala lui Basedow se constată valori hipotetraploide, iar în adenocar-

cinomul folicular, nuclei hipertetraploizi (fig. 58). Valoarea medie a cantităţii de ADN (exprimată în unităţi arbitrare de densitate optică — UDO) atinge cifra cea mai ridicată (45 UDO) în cancer (532). Într-un studiu amplu consacrat modificărilor citofotometrice şi citogenetice în nodulii tiroidieni, Haemmerli (222) constată că 75% din adenoamele microfoliculare şi 80% din nodulii oncocitari prezintă valori crescute ale ADN, ceea ce ridică problema posibilei lor transformări neoplazice.

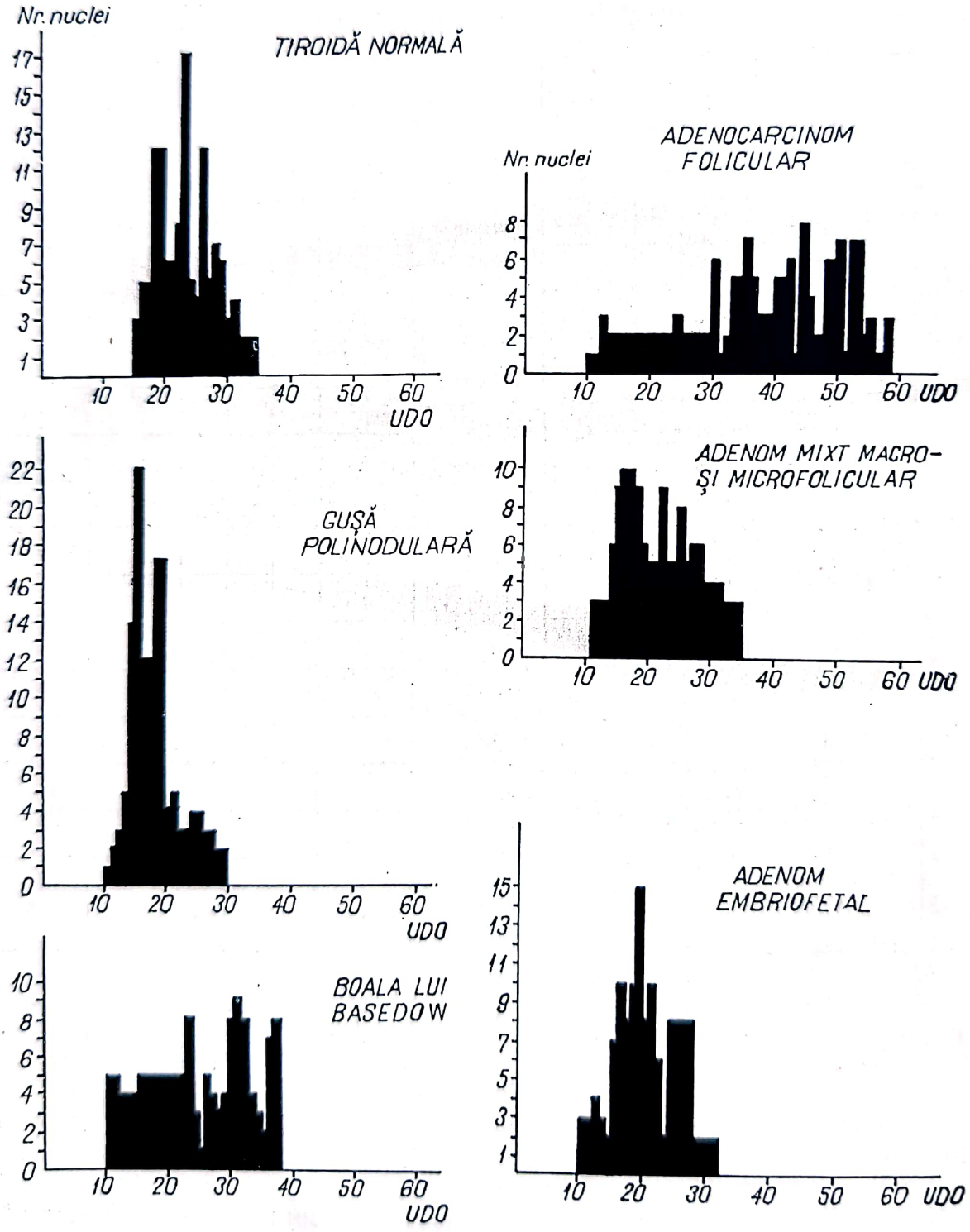



Fig. 58. — Histogramele cantităţii de ADN în diverse tireopatii.

## Paratiroida

Engfeldt (160), studiind paratiroidele şobolanilor cu dietă bogată în calciu şi trataţi cu $AT_{10}$, a observat o diminuare a nucleilor paratiroidieni ; alimentaţia bogată în fosfor şi săracă în calciu are efecte contrare. Sandritter şi colab. (470) au urmărit paratiroidele în hiperparatiroidismul primar, indus prin parathormon, şi în cel secundar, provocat prin leziuni renale cu nitrat de uranil sau glicerofosfat de fier. Autorii găsesc cea mai mare cantitate de nucleoproteine în celulele clare de tranziţie, ceea ce a sugerat ideea că aceste celule ar fi sediul de formare a parathormonului.

## Pancreasul endocrin

Primele măsurători nucleare în pancreasul endocrin au fost efectuate de Hintzsche (268). Fluctuaţiile glicemiei şi producţiei de insulină sînt în strînsă legătură cu variaţiile volumelor nucleare ale celulelor B. Administrarea de glucoză determină la numai 15 min o creştere cu 40 % a volumelor nucleare. Insulina inhibă producţia de hormon endogen şi scade volumele nucleare ale celulelor B. Dimpotrivă, în celulele A se observă o creştere a volumelor nucleare (412). Antidiabeticele orale intensifică activitatea celulelor B şi determină creşterea volumelor nucleare ale acestora. Derivaţii de sulfanil-uree induc o creştere rapidă a nucleilor celulelor B, în timp ce biguanidele sînt eficiente numai după administrare repetată. O funcţie ritmică a celulelor A şi B a fost remarcată de Hellmann şi Hellerström (243), care semnalează o curbă nucleară bimaximală pentru celulele B, în timp ce celulele A prezintă un traseu unimaximal.

## *Sistemul nervos*

Hodge (272) în 1888 a fost unul dintre primii cercetători interesaţi în modificările celulelor ganglionare şi a nucleilor acestora. Într-o serie de experienţe, Hodge arată că stimularea electrică a celulelor din ganglionul rădăcinilor dorsale la broască şi pisică duce la scăderea mărimii nucleare. Existenţa unor atare variaţii morfofuncţionale au fost discutate ceva mai tîrziu de Lambert (324) şi de Mann (355). După 15 min de stimulare faradică se observă o creştere nucleară evidentă, urmată de o scădere, dacă stimularea se prelungeşte pînă la 6—9 ore. În 1901 Marinescu (358) secţionînd nervul hipoglos de iepure, semnalează o diminuare a celulei nervoase, nucleului şi nucleolului în ganglionii nervoşi corespunzători. Dezvoltînd cercetări biometrice asupra neuronului, Marinescu constată că volumul neuronal este în legătură cu funcţionalitatea sa. Celulele Betz afectate membrelor inferioare sînt mai voluminoase decît cele corespunzătoare membrelor superioare. Celulele Betz din centrul cortical al feţii sînt mai puţin voluminoase decît cele pentru membrele superioare şi inferioare. Se observă de asemenea o dependenţă între mărimea neuronului şi specia animalului, precum şi între dimensiunile neuronale şi vîrstă.

Scanned with OKEN Scanner

Concomitent cu aceste aprecieri citocariometrice Marinescu a urmărit grosimea diferitelor straturi neuronale din circumvoluţia frontală anterioară. Calculînd separat grosimea fiecărui strat neuronal în diferite zone ale scoarţei, în raport cu grosimea totală a cortextului, Marinescu (359) ca şi Economo (148) stabilesc următoarele raporturi între straturi: pe convexitatea circumvoluţiei raportul straturilor I : II : III : IV : V : VI = 9 : 7 : 33 : 9 : 20 : 22; la jumătatea înălţimii feţei laterale a circumvoluţiei raportul este 12 : 7 : 37 : 8 : 18 : 18, iar în fundul şanţului 27 : 15 : 30 : 12 : 10 : 8.

Aceste cifre demonstrează că straturile I şi II cresc relativ semnificativ către fundul şanţului, straturile III şi IV se modifică insensibil, iar V şi VI se subţiază.

Problema mărimii celulare şi nucleare în sistemul nervos central a suscitat de mult timp interesul ca urmare a părerii că celulele ganglionare din sistemul nervos sînt incapabile de diviziune. Aceasta implică faptul că în procesul de creştere postnatală al sistemului nervos intervine numai hipertrofia celulară. În acest sens, s-a observat că diametrul mediu al celulelor ganglionare din rădăcinile posterioare creşte permanent de la nou-născut la adult. La şobolanii în greutate de 10,3; 24,5; 68,5 şi 167 g diametrul mediu nuclear al celulelor ganglionare în $L_2$ este, respectiv, de 12,5; 14,7; 15,8 şi 17,5 μ.

Inabilitatea celulelor ganglionare, cel puţin în sistemul nervos central, de a creşte ca număr ridică probleme speciale cu privire la regenerarea ţesutului distrus.

Terni (534) a studiat efectul amputării cozii la şopîrla *Gongylus acellatus* asupra mărimii celulelor neuronale în măduva spinării. La şopîrla normală există o diminuare treptată a nucleilor neuronali, de la 850 $\mu^3$ în neuronii proximali la 300 $\mu^3$ în cei distali. După amputare, celulele din măduva restantă îşi măresc volumul pînă la 1 700 $\mu^3$. Wendt (560) amputează unilateral membrele la şoarece pentru a urmări hipertrofia celulelor din cornul anterior în corelaţie cu hipertrofia musculaturii membrelor restante. La 61 de zile după operaţie se constată o dextrodeviere a traseului cariometric de partea membrelor restante, suprafaţa neuronală excedînd 20%. O creştere atît a numărului, cît şi a dimensiunilor celulelor ganglionare a fost observată în plexul mienteric proximal de locul aplicării unei ligaturi incomplete pe intestin (38), (39).

Efectul lipsei de apă asupra nucleilor neuronali din ganglionii supraoptic şi paraventricular a fost urmărit de Macher (353). La 3 zile de la instalarea regimului fără apă, volumul nuclear creşte cu 12%. La cîine, creşterea volumului nuclear este de 16—19% după 8 zile şi de 37—49% după 14 zile de regim fără apă (153). La şoarecii obligaţi să înoate se observă o creştere numerică şi volumetrică a nucleilor celulelor gliale întunecate şi clare din cornul motor al măduvei spinării.

Determinările cariometrice în sistemul nervos sînt în general mai dificile datorită marii variabilităţi a tipurilor celulare.

În teleencefal, Hertwig (259) constată că nucleii celulelor piramidale din alocortex au volume duble în comparaţie cu nucleii celulelor piramidale din neocortex.

În observaţii personale de cariometrie (102), (523), executate pe nucleii celulelor din stratul piramidal intern la decedaţi prin leziuni vasculare cerebrale, am arătat variaţii volumetrice legate de vîrstă. Materialul

nostru cuprinde cazuri între 5 şi 117 ani. Volumul nuclear mediu scade de la 440 $\mu^3$ la 5 ani (fig. 59) la 400 $\mu^3$ la 117 ani (fig. 60 şi 61). La senescenţi, traseul cariometric are tendinţa de a lua un aspect în platou accidentat pentru procentele maxime. Această dispoziţie poate fi corelată cu neomogenitatea nucleilor la vîrste înaintate (98), (100). Atrofia neuronală la senescenţi, concomitent cu acumularea de lipofuscină, relevată încă de Babeş şi Marinescu, a fost mai recent studiată de Parhon şi elevii săi. Atrofia în senescenţa normală constă din lezarea unor neuroni, de la cromatoliză perinucleară la dispariţia nucleului împreună cu satelitoză şi neuronofagie. Un alt tip de atrofie neuronală rezultă prin leziuni arteriale de ateromatoză şi/sau hialinoză. În această direcţie, Crăciun şi Mareş (100) deosebesc neuronofagia lipsită de satelitoză de neuronofagia patologică, totdeauna însoţită de satelitoză.

Numeroase date au fost publicate cu privire la cariometria nucleilor supraoptic şi paraventricular. Nucleul supraoptic poate fi considerat ca fiind format dintr-o populaţie celulară omogenă, cu nuclei mari, sferoidali (E = 1,3). Nucleul paraventricular este compus din două tipuri celulare, dar porţiunile macro- şi microcelulară nu sînt net distincte. Celulele mari se găsesc în porţiunea dorso-laterală a nucleului, iar cele mici în regiunea medială, amestecîndu-se însă cu cele mari atît în direcţia orală, cît şi în cea caudală.

Numeroşi autori au observat modificări nucleare şi nucleolare în nucleii supraoptici datorită devierilor echilibrului hidric. Stressul prin administrare de formol (313), şocul electric (17), (444), acidul tanic (313) atrag retracţii nucleare şi nucleolare. O tumefiere nucleară intensă în celulele nucleului paraventricular a fost observată prin deshidratare sau administrare de hormon tireotrop, tiroxină, estrogeni, DOCA, ACTH şi cortizon (334). Nucleul supraoptic nu reacţionează la aceste tratamente. Castrarea atrage o scădere a volumelor nucleare în ambii nuclei. Interrelaţia dintre nucleul supraoptic şi pineală a fost studiată de Kaiserman-Abramov şi colab. (295), Machado şi colab. (352). Au fost descrise variaţii ritmice diurne (383) şi sezoniere (334) ale volumului nuclear în neuronii din nucleii supraoptic şi paraventricular.

Nucleul suprachiasmatic are nuclei mici, rotunjiţi (E = 1,2), destul de uniformi.

Nucleul hipotalamic anterior prezintă în cele trei porţiuni : orală, ventrală şi dorsală, volume nucleare diferite, ceea ce impune determinări cariometrice separate. Estrogenii, testosteronul şi castrarea atrag o scădere a volumelor nucleare.

Nucleul periventricular este format dintr-o porţiune anterioară cu volume nucleare medii de 109—158 $\mu^3$ şi una posterioară cu volume nucleare de 141—155 $\mu^3$.

Nucleul ventro-medial se subdivide din punct de vedere citologic şi cariometric în 5 porţiuni. În regiunea posterioară, Hertl (251) observă o dextrodeviere cariometrică în cursul diestrului. O levodeviere a traseelor cariometrice a fost înregistrată după tiroxină. După Halasz şi Szentagothai (224) volumele nucleare cresc în urma administrării de cortizon, suprarenalectomie sau denervarea glandei suprarenale.

În nucleul dorso-medial, tiouracilul, ACTH şi stressul atrag scăderi ale volumelor nucleare, în timp ce suprarenalectomia, estrogenii, testosteronul şi castrarea determină o uşoară dextrodeviere a cariogramei.

Scanned with OKEN Scanner

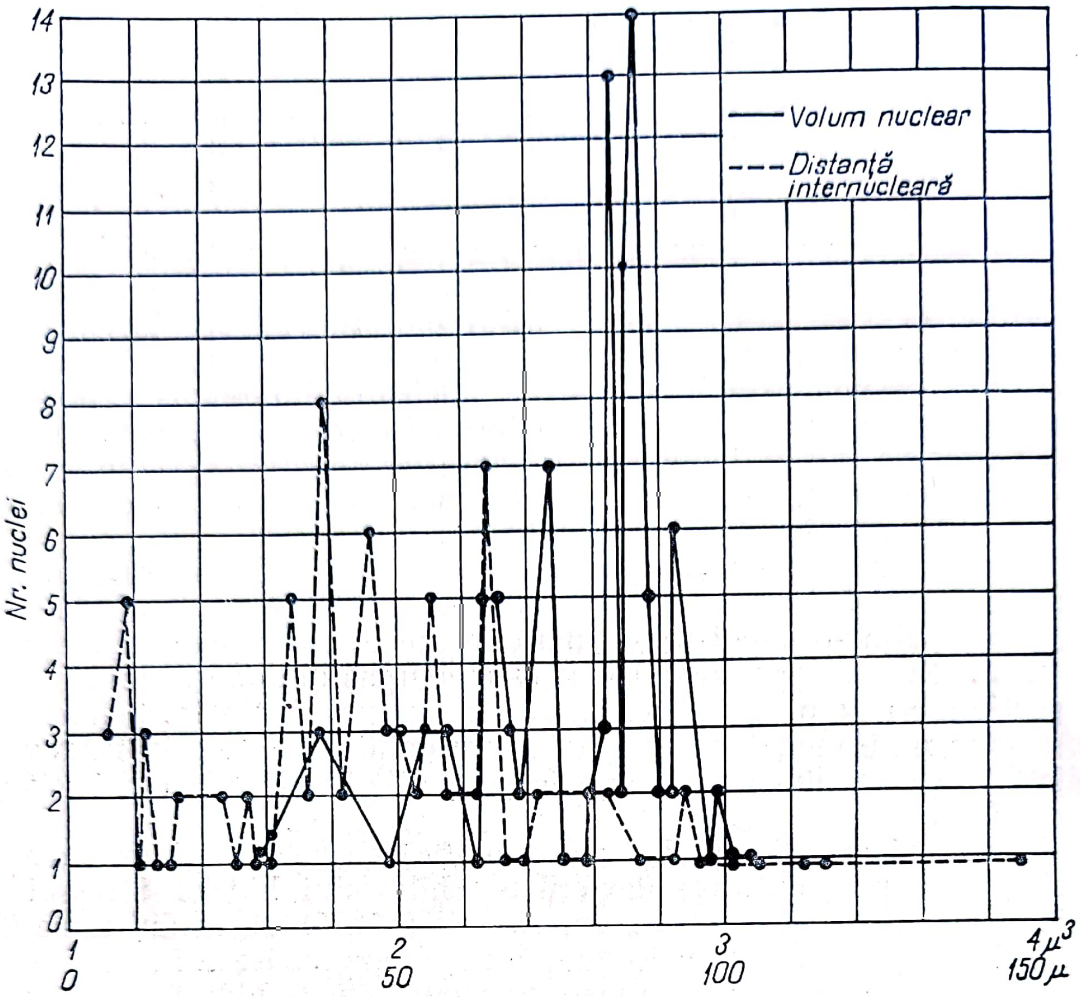



Fig. 59. — Traseul cario-intercariometric în scoarța cerebrală la un copil de 5 ani.

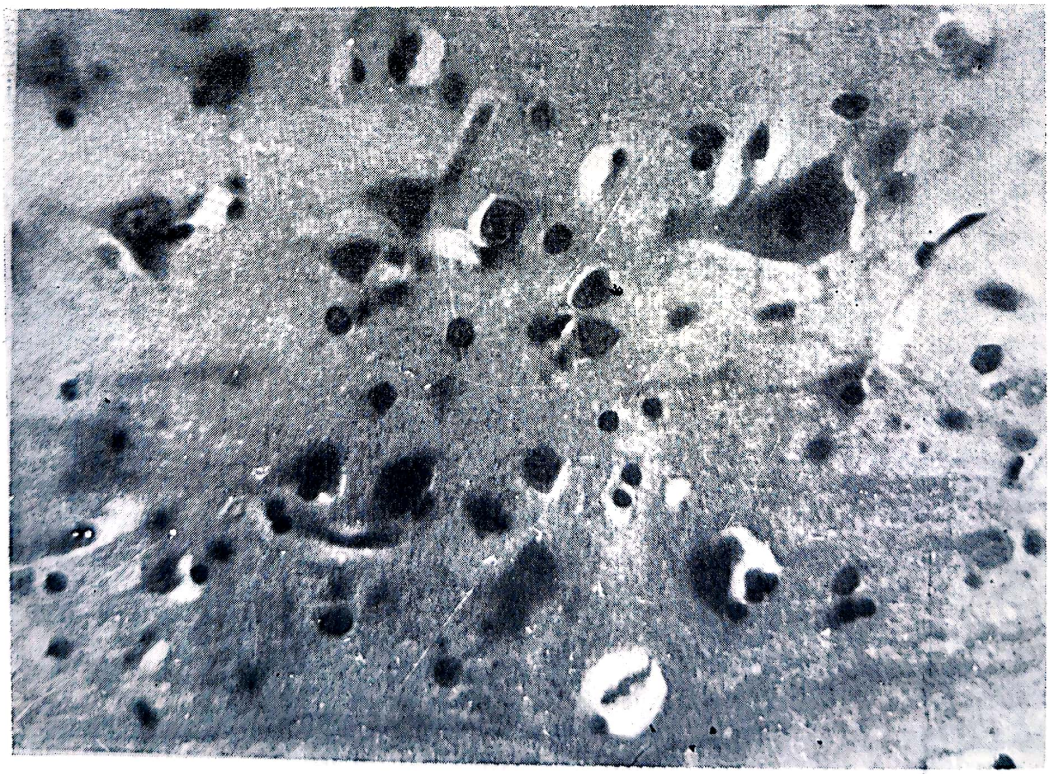


Fig. 60. — Leziuni neuronale la 117 ani.

Scanned with OKEN Scanner

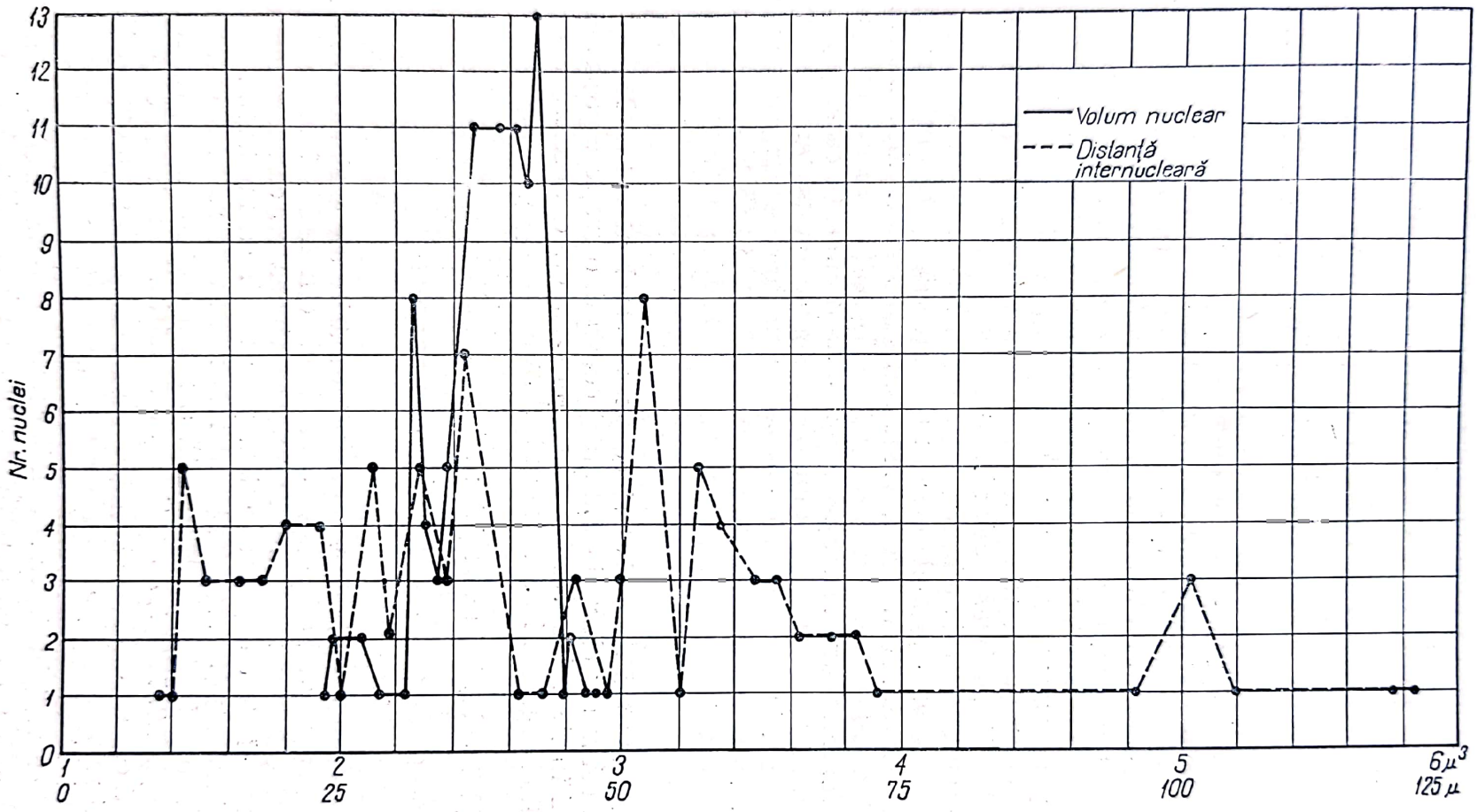



Fig. 61. — Traseul cario-intercariometric în scoarța cerebrală la 117 ani.

Nucleul arcuat poate fi divizat din punct de vedere cariometric în 5 porţiuni, avînd în sens ovocaudal următoarele volume medii nucleare : 179, 153, 176, 191 şi 155 $\mu^3$. Sub efectul estrogenilor s-a observat o creştere cu 60% a volumului nuclear în porţiunea posterioară a nucleului.

În nucleul medial habenular se constată o scădere marcantă a volumului nuclear după tiroidectomie. Tiouracilul, tiroxina, castrarea, suprarenalectomia şi estrogenii produc o diminuare moderată a volumelor nucleare.

Organul subfornical reacţionează la tratamentul cu DOCA şi cu ser salin hipertonic printr-o scădere considerabilă a volumelor nucleare. Organul subcomisural constă din două tipuri celulare diferite, unele cu nuclei mari, ovoizi, clari, celelalte cu nuclei ceva mai mici, întunecaţi. Administrarea de adrenalină atrage o creştere cu 55% a volumelor nucleare.

În cerebel, determinările cariometrice au vizat în special celulele Purkinje, ai căror nuclei voluminoşi se pretează la cantificări. Hertwig (256), (259) remarcă raportul 1 : 2 : 4 între nucleii celulelor granulare, astrocitelor şi celulelor Purkinje.

Celulele motorii din cornul anterior al măduvei spinării au fost urmărite din punct de vedere cariometric în diferite condiţii experimentale. Alteraţii funcţionale ale celulelor motorii induc modificări şi ale elementelor gliale. Modificări ritmice diurne au fost evidenţiate în nucleii ependimului spinal : volumul nuclear creşte începînd de dimineaţă către prînz şi scade spre seară. Din studii citofotometrice practicate în sistemul nervos rezultă că masa de ADN din nucleii celulelor Purkinje la om, şobolan şi pisică depăşeşte nivelul diploid (59), (249), (250), (328), (329), (386). Observaţii similare au fost comunicate pentru neuronii din ganglionul cervical superior la iepure (320), cortexul cerebral la şobolan şi pisică (249), (250), (396), (518). Un conţinut crescut în ADN a fost determinat şi în astrocitele Bergman (328) din cerebel şi cortextul cerebral (518). Mareş şi colab. (357), precum şi Cohen şi colab. (91) constată o creştere postnatală a conţinutului în ADN în cerebelul de şoarece, cu o accelerare între zilele 11 şi 25.

## *Boala canceroasă*

Una dintre aplicaţiile îndelung urmărite ale cariometriei a fost studiul cantitativ al bolii canceroase. Încă din 1834, înainte de apariţia patologiei celulare moderne, Hannover afirma că celula canceroasă este un element heterolog, caracterizat prin mărimea nucleului.

Primul studiu amănunţit al mărimii nucleare în neoplazii folosind tabele cu distribuţia de frecventă a măsurătorilor aparţine lui Heiberg (234) care, în 1907 atrage atenţia asupra mărimii nucleilor canceroşi, subliniind însă că se pot întîlni şi nuclei neoplazici mici. Ca o explicaţie posibilă a măririi nucleare, Heiberg propune hipertrofia funcţională sau creşterea numărului şi dimensiunilor cromozomilor. Cîţiva ani mai tîrziu, Borst consideră că variabilitatea mărimilor nucleare este un criteriu mai selectiv pentru boala canceroasă decît simpla cariomegalie. Mac Carty (350) subliniază, în 1927, importanţa dimensionărilor nucleolare, cărora le

acordă semnificaţie diagnostică. În 1950, Caspersson (76) argumentează că mărirea volumetrică a nucleolului indică o funcţie celulară crescută.

Curînd după prima publicaţie a lui Jacobj (283) asupra creşterii nucleare în proporţii constante, Arndt (14) găseşte în adenomul hepatic 3 clase de volume nucleare în raportul 1 : 2 : 4, fiecare clasă prezentînd volume cu 25% mai mari decît clasele corespunzătoare din ficatul normal. Ehrich (153) constată în papiloamele cutanate şi în fibroadenoamele mamare volume nucleare cu peste 50% mai mari decît în ţesutul normal corespunzător. Kloos şi Steffen (306) ajung la concluzia că trăsătura caracteristică a tumorilor maligne nu este dedublarea volumului nuclear din ţesutul de origine, ci apariţia lanţurilor deviate („Abweichungsketten"), adică dedublări succesive ale volumelor, care nu se întîlnesc în mod normal în ţesutul matcă. Fără îndoială că prezenţa acestor lanţuri deviate trebuie corelată cu apariţia claselor nucleare intermediare. Büngeler (68), referindu-se la lucrarea lui Kloos şi Steffen, conchide că nu există diferenţe citologice de bază între celulele tumorale şi elementele celulare din procesele regenerative. Foraker (180) găseşte dextrodevieri mai accentuate ale traseelor cariometrice în carcinomul pavimentos şi carcinomul intraepitelial al colului uterin, în comparaţie cu metaplazia pavimentoasă. Foraker şi Reagan (181) observă că hiperplazia atipică a colului uterin ocupă, din punct de vedere cariometric, o poziţie intermediară între metaplazie şi carcinom.

Aplicarea tehnicilor cantitative în patologia tumorală a adus numeroase date care, analizate în contextul anatomoclinic, pot aduce indicaţii utile pentru diagnostic şi chiar pentru prognostic.

Urmărind cazuri de cancer mamar cu variate aspecte anatomopatologice, Schiemer (486), (487) constată diferenţe foarte mari faţă de mamela normală atît din punctul de vedere al microscopiei de interferenţă, cît şi al citofotometriei în lumină ultravioletă şi în lumină vizibilă. În microscopia de interferenţă volumele nucleare oscilează între 202 şi 1 146 $\mu^3$, iar volumele citoplasmatice de la 289 la 1 822 $\mu^3$. Masa uscată este situată pentru nucleu între $31{,}2 \times 10^{-12}$ g şi $131 \times 10^{-12}$ g, iar pentru citoplasmă între $22{,}1 \times 10^{-12}$ g şi $117 \times 10^{-12}$ g. Procentajul valorilor greutăţii uscate oscilează pentru nucleu între 9,0 şi 23,4 g la 100 ml şi pentru citoplasmă între 4,7 şi 12,2 g la 100 ml. Valorile ADN obţinute în lumină ultravioletă se situează între 3,5 şi 14,2 UA.

Leziunile premaligne şi maligne ale colului uterin au făcut obiectul a numeroase cercetări (20), (21), (22), (74), (542). Conţinutul în ADN al celulelor epiteliale normale din colul uterin se înscrie pe o curbă simetrică în jurul valorilor diploide. Populaţia tumorală prezintă valori tetraploide şi octoploide. Nucleii aparţinînd celulelor premaligne se situează în regiunea hipotetraploidă. Determinările la microscopul de interferenţă indică o scădere considerabilă a masei uscate în epiteliul neoplazic în comparaţie cu celulele normale.

Pentru a urmări relaţia dintre volumul nuclear şi cantitatea de ADN în nucleii carcinomului *in situ* şi ai cancerului invadant la nivelul colului uterin, Valeri şi colab. (542) propun noţiunea de „indice megetic" (megethos = volum). Cînd se compară două populaţii nucleare, de exemplu nuclei canceroşi şi nuclei normali, populaţia neoplazică apare „hipomegetică", dacă raportul log volum nuclear (VN)/log ADN este scăzut. Aceasta

Scanned with OKEN Scanner

înseamnă că celulele neoplazice au un conţinut crescut de ADN în comparaţie cu celulele „eumegetice". Din examenul datelor furnizate de analiza de regresiune între volumele nucleare şi cantitatea de ADN rezultă că nu există diferenţe în privinţa cantităţii de ADN între cancerul *in situ* şi cel invadant.

## Oncologie experimentală

În oncologia experimentală metodele cantitative şi-au găsit un larg cîmp de aplicaţie. Heinkele (239) sub impulsul lucrărilor lui Jacobj a descris modificări ale volumului nuclear în adenocarcinomul de mamelă la şoarece. Langer (327) descrie ca prime modificări în ficatul şobolanilor alimentaţi cu galben de unt apariţia de macronuclei. O creştere progresivă a mărimii nucleare înainte de apariţia cancerului a fost descrisă în pielea şoarecilor trataţi cu agenţi cancerigeni. Astfel de observaţii au fost comunicate de Page (406) la 48 de ore după aplicarea agentului cancerigen, de Kraemer (314) după 10 zile şi de Cowdry şi Paletta (96) după 13 zile de tratament. Dontenwill (141) constată că postul, hipofizectomia, suprarenalectomia, ovariectomia, orhidectomia cu sau fără asociere de DOCA sau cortizon sînt însoţite de modificări importante ale greutăţii tumorilor cutanate induse prin benzpiren şi ale carcinoamelor Walker la şobolani, deşi frecvenţa distribuţiei volumelor nucleare rămîne constantă. Numărătorile de cromozomi la un mare număr de tumori transplantate relevă apariţia de celule intermediare şi poliploide dezvoltate din tumori predominant diploide. Hauschka (233) găseşte că timomul DBA, adenocarcinomul mamar TA3 şi limfosarcomul 6C3 HED cu populaţia celulară predominant diploidă supravieţuiesc mai puţin decît rabdomiosarcomul MCIA, carcinomul anaplazic Krebs 2, carcinomul Ehrlich şi sarcomul 37, care conţin numeroase celule tetraploide şi aneuploide. Gati şi colab. (193) au folosit volumul nuclear ca indice al activităţii colchicinei şi podofilinei. Aceste substanţe determină deplasarea cariogramelor spre dreapta, creşterea volumetrică maximă fiind atinsă la 12 ore după colchicină şi la 6 ore după podofilină.

În cercetări personale (527), (530), (531) am întreprins măsurători ale cantităţii de acizi nucleici şi ale histonelor în polipul traheal al hamsterului (fig. 62), produs prin dietilnitrosamină (DENA), în cancerul cutanat prin benzpiren şi în hepatomul malign prin DENA. Determinările au fost efectuate cu histofotometrul universal (UMSP I). Am folosit tehnicile : Feulgen, galocianin-cromalaun şi coloraţia cu fast-green pentru histone. Paralel am practicat şi măsurători în lumină ultravioletă la lungimile de undă : 2 630 A (absorbţia maximă a bazelor acizilor nucleici), 2 800 A (absorbţia maximă a proteinelor) şi la 3 130 A (absorbţia nespecifică). Rezultatele au fost calculate după formula celor 3 lungimi de undă a lui Sandritter :

$$M = 0{,}92 \int E_{2630} - 0{,}75 \int E_{2800} - 0{,}25 \int E_{3130}.$$

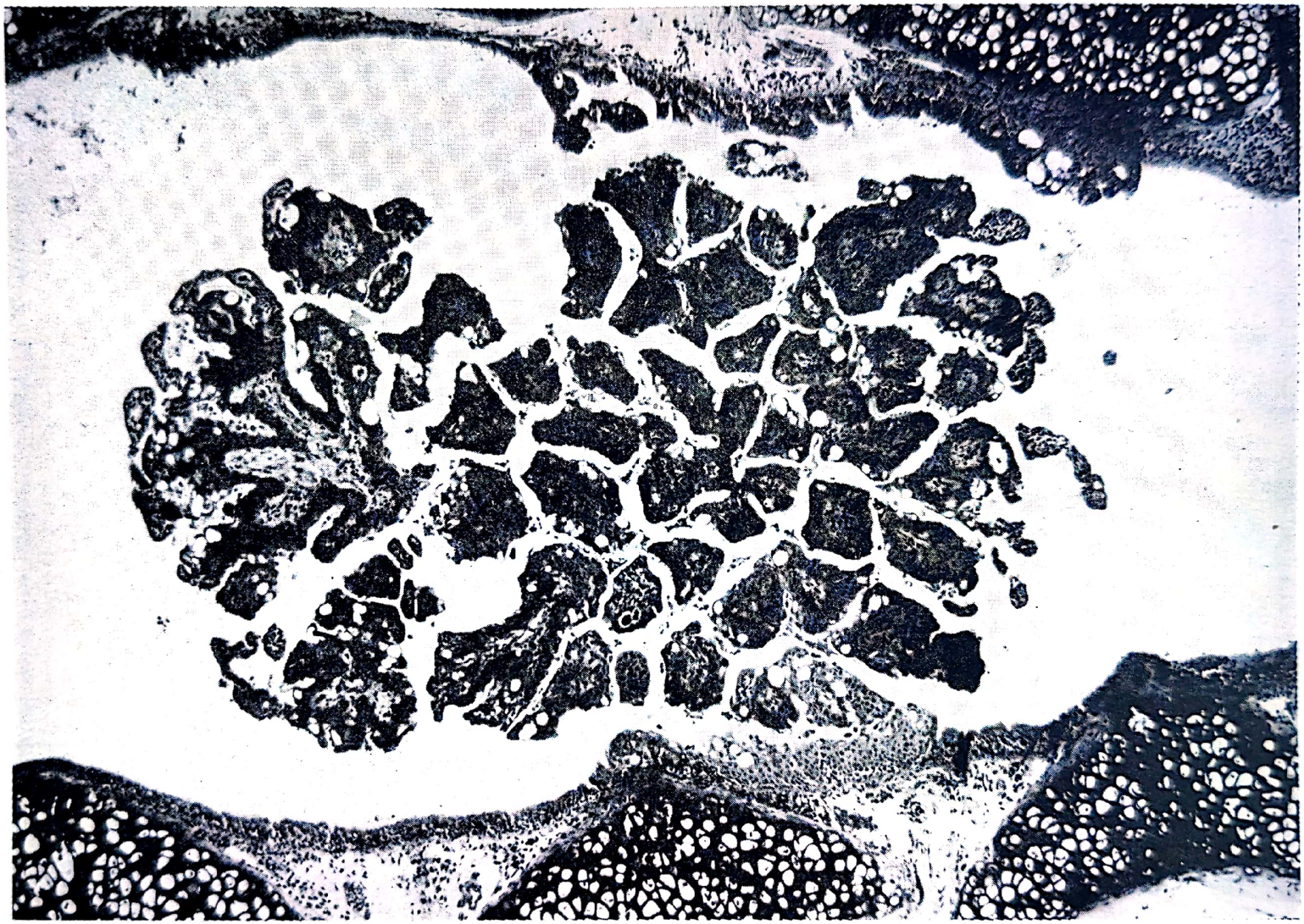


Fig. 62. — Polip traheal obținut la hamsterul auriu prin administrare de dietilnitrosamină (col. HE; × 50).



Scanned with OKEN Scanner

Coeficienţii de extincţie decadici (E′), exprimaţi în $10^4$ $cm^2$ $g^{-1}$, au fost : 0,916 pentru Feulgen, 1,280 pentru galocianin-cromalaun, 1,200 pentru fast-green, 2,00 pentru UV. Au fost folosite ca lungimi de undă în lumină vizibilă : 5 650, 6 250 şi 2 630 A pentru Feulgen, galocianin-cromalaun şi fast-green.

Volumul nuclear, calculat după formula : $V = 0{,}75\sqrt{S^3}$ (S = suprafaţa), a fost corectat pentru o retracţie de 8%.

În lumină ultravioletă, mucoasa traheală normală prezintă nuclei sferici sau cilindrici, dispuşi în două-trei straturi, cu un grad intens de înnegrire datorită unei concentraţii mari de acizi nucleici (fig. 63). Epiteliul de înveliş al polipului traheal este fin structurat, ramificat, mai rar compact. Alături de formaţiuni polipoase, acoperite de celule cilindrice sau cuboidale, se găsesc plaje epiteliale întinse cu metaplazie cuboidală. Nucleii, în contrast net cu nucleii traheei normale, sînt evident măriţi, rotunzi, poligonali sau elipsoidali. Atrage în special atenţia absorbţia scăzută în ultraviolet, corespunzînd unei concentraţii diminuate a acizilor nucleici. Cromatina nucleară apare neregulat distribuită în mici grămezi, la marginea membranei nucleare (fig. 63). Din datele citofotometrice rezultă că volumele nucleare în mucoasa traheală normală oscilează în jur de 90 $\mu^3$. Nucleii din polipul traheal sînt aproape dubli, între 150 şi 180 $\mu^3$.

Măsurătorile efectuate pe preparate colorate cu galocianin-cromalaun relevă în nucleii traheei normale un conţinut mediu în acizi nucleici de $7{,}3 \times 10^{-12}$ g, iar în coloraţia Feulgen, o cantitate de ADN de $6{,}2 \times 10^{-12}$ g. Conţinutul în histone, evidenţiat cu fast-green a fost de $4{,}4 \times 10^{-12}$ g. Cantităţi foarte asemănătoare de acizi nucleici, ADN şi histone au fost constatate şi în nucleii polipului.

Concentraţia în acizi nucleici, ADN şi histone prezintă diferenţe mari între nucleii polipului şi ai mucoasei traheale normale. În nucleii normali am găsit concentraţii medii de 8,4, 7,9 şi 4,4% pentru acizii nucleici, ADN şi, respectiv, histone. În nucleii polipului valorile au fost 5,4, 3,8 şi 2,8%. Aceste diferenţe corespund deosebirilor de colorabilitate din preparatele histologice.

Analizele de frecvenţă reliefează încă mai pregnant tendinţele manifestate în valorile medii enunţate. În histograma din figura 64 sînt reprezentate grafic frecvenţele pentru volume nucleare, conţinutul în ADN şi concentraţia în ADN. Maximele de frecvenţă ale volumelor nucleare apar la polip net deplasate spre dreapta în comparaţie cu traheea normală. Dimpotrivă, valorile cantităţii de ADN sînt identice, egale cu $6{,}3 \times 10^{-12}$ g, în ambele grupări celulare, corespunzînd deci populaţiei celulare diploide. Concentraţia acizilor nucleici, ADN şi histonelor este net levodeviată în cazul polipului.

Din calculul analizelor de regresiune rezultă că între volumul nuclear şi cantitatea de acizi nucleici, respectiv histone, există o corelaţie care se poate exprima sub forma :

cantitatea de substanţă = concentraţia × volumul + constanta.

Scanned with OKEN Scanner

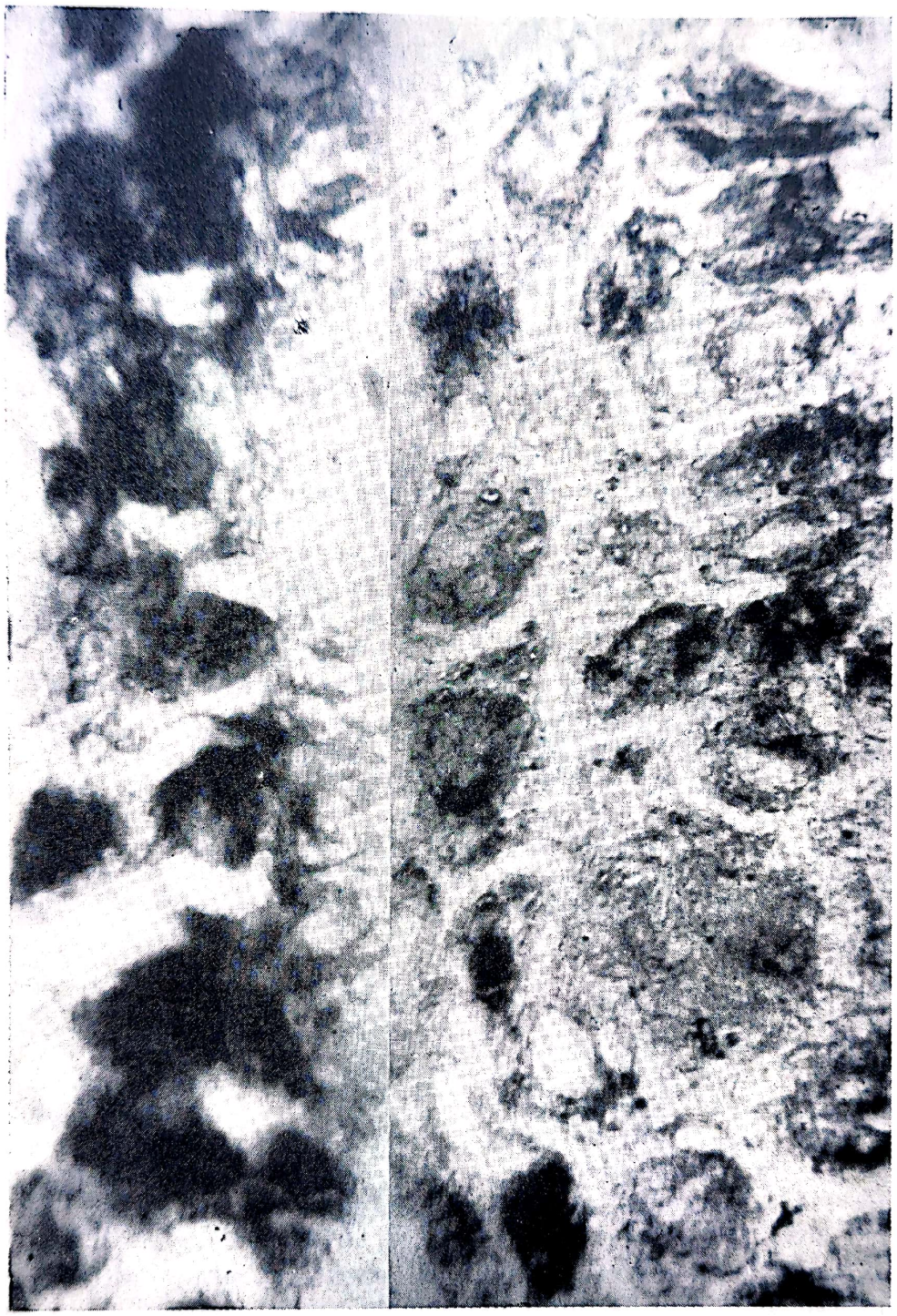


Fig. 63. — Mucoasa traheală normală și polipul traheal fotografiate în lumină ultravioletă la UMSP I. În mucoasa traheală se observă un grad mai intens de înnegrire, corespunzînd unei cantități sporite de acizi nucleici, în comparație cu polipul (obiectiv ultrafluar; × 1 200).

Scanned with OKEN Scanner

Independent de metoda de colorație, conținutul în ADN și acizi nucleici (M) al mucoasei traheale normale și al polipului traheal ca funcție a volumului (V) se traduce prin ecuațiile :

$$M_{\text{trahee normală}} = (0{,}031\ \text{cm}^{-3}V + 1{,}10) \times 10^{-12}\ \text{g};$$

$$M_{\text{polip}} = (0{,}015\ \text{cm}^{-3}V + 4{,}40) \times 10^{-12}\ \text{g}.$$

În aceste egalități, cantitatea de substanță și volumul nuclear trebuie privite ca variabile stochastice. Coeficienții de corelație care reprezintă gradul de siguranță pentru o atare ecuație sînt, pe materialul nostru, de 0,52—0,55. Dreapta corespunzînd polipului este mai puțin abruptă decît dreapta mucoasei traheale normale. Divergența celor două drepte indică o pierdere a diferențierii celulare în două populații cu conținut identic în ADN (fig. 65).

În continuarea cercetărilor am urmărit modificările din adenomul și carcinomul hepatic induse prin dietilnitrosamină. În figura 66 se observă zona de frontieră a unui adenom hepatic cu epiteliile hepatice netrasformate tumoral. În teritoriile hepatice intacte, nucleii prezintă o reacție Feulgen mult mai accentuată și deci un conținut mai bogat în ADN, corespunzînd unui număr sporit de nuclei tetraploizi și în faza de sinteză. Nucleii hepatomului apar măriți ca volum, dar foarte palizi, ceea ce traduce o scădere considerabilă a conținutului în ADN (fig. 67).

În histogramele din figura 68 se constată o creștere marcantă a volumelor nucleare în diferitele etape, de la ficatul normal pînă la cancerul hepatic. Cantitatea de ADN rămîne practic constantă, corespunzînd populațiilor tetraploide. O hipertetraploidie evidentă se observă numai în ficatul tratat cu dietilnitrosamină, dar netransformat încă tumoral. Concentrația ADN este scăzută față de normal în toate etapele cancerizării hepatice, cu excepția zonelor peritumorale din ficatul tratat cu dietilnitrosamină.

Un alt model experimental investigat citofotometric este cancerul cutanat obținut la șoarece cu 3,4-benzpiren. Cu această substanță pot fi produse hiperplazii, papiloame și epitelioame cutanate. În figura 69 este prezentat ansamblul unei secțiuni prin pielea de șobolan, în care se observă la suprafață aspecte papilomatoase, iar în profunzime zona neoplazică. La un obiectiv mai mare (fig. 70) se constată în această zonă nuclei inegali și intens colorați. O imagine a unui preparat necolorat de piele, montat pe o lamă de cuarț și fotografiat în lumină ultravioletă (fig. 71 și 72), indică un conținut bogat în acizi nucleici în nucleii tumorali.

Histograma efectuată la nivelul tegumentului fără modificări morfologice, situat la distanță de zonele neoplazice, precum și în diferitele structuri benigne și maligne cutanate atestă o dextrodeviere foarte marcantă a volumelor nucleare în teritoriile cu cancer, depășind 2 400 $\mu^3$ și a cantității de ADN, care ajunge la valori de peste $104 \times 10^{-12}$ g per nucleu (fig. 73). Cercetători din școala lui Sandritter (449) s-au ocupat de distribuția ADN în cursul hiperplaziilor epiteliale cutanate la șoarece după iritație mecanică și după aplicare de ulei de muștar, metilcolantren, 9-10-dimetil-1,2-benzantracen (DMBA) și ulei de croton.

Scanned with OKEN Scanner

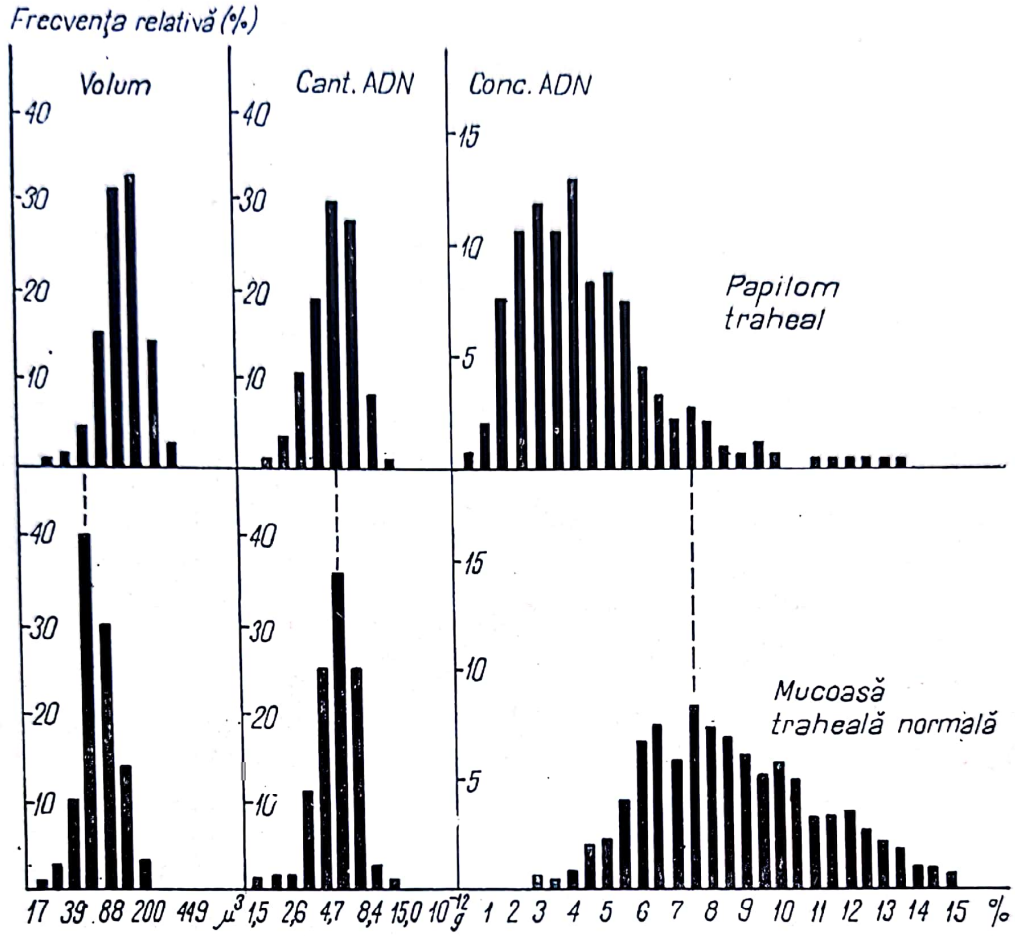

Frecvența relativă (%)
Volum
Cant. ADN
Conc. ADN
Papilom traheal
Mucoasă traheală normală
17 39 88 200 449 μ³
1,5 2,6 4,7 8,4 15,0 10⁻¹² g
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 %

Fig. 64. — Histograma papilomului traheal și a mucoasei traheale normale. Volumele nucleare sînt mărite în papilom, dar cantitatea de ADN rămîne egală în papilom și în mucoasa traheală normală. Levodeviere a concentrației de ADN în nucleii tumorali.

Iritația mecanică prin frecare cu smirghel determină o scădere a numărului nucleilor diploizi și o creștere concomitentă a tetraploidiei. Rezultate similare se obțin după ulei de mușt ar. Aplicarea de metilcolantren atrage o proliferare celulară în toate straturile epiteliale cu predomi-

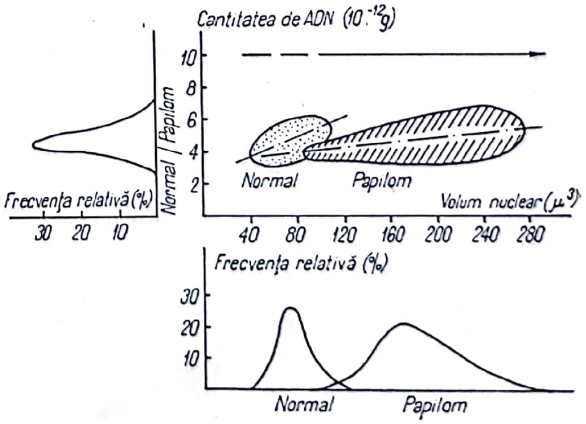



Fig. 65. — Deplasarea corelației volum nuclear/cantitatea de ADN între mucoasa traheală normală și papilomul traheal. Divergența celor două drepte indică o pierdere a diferențierii celulare în două populații cu conținut identic în ADN.

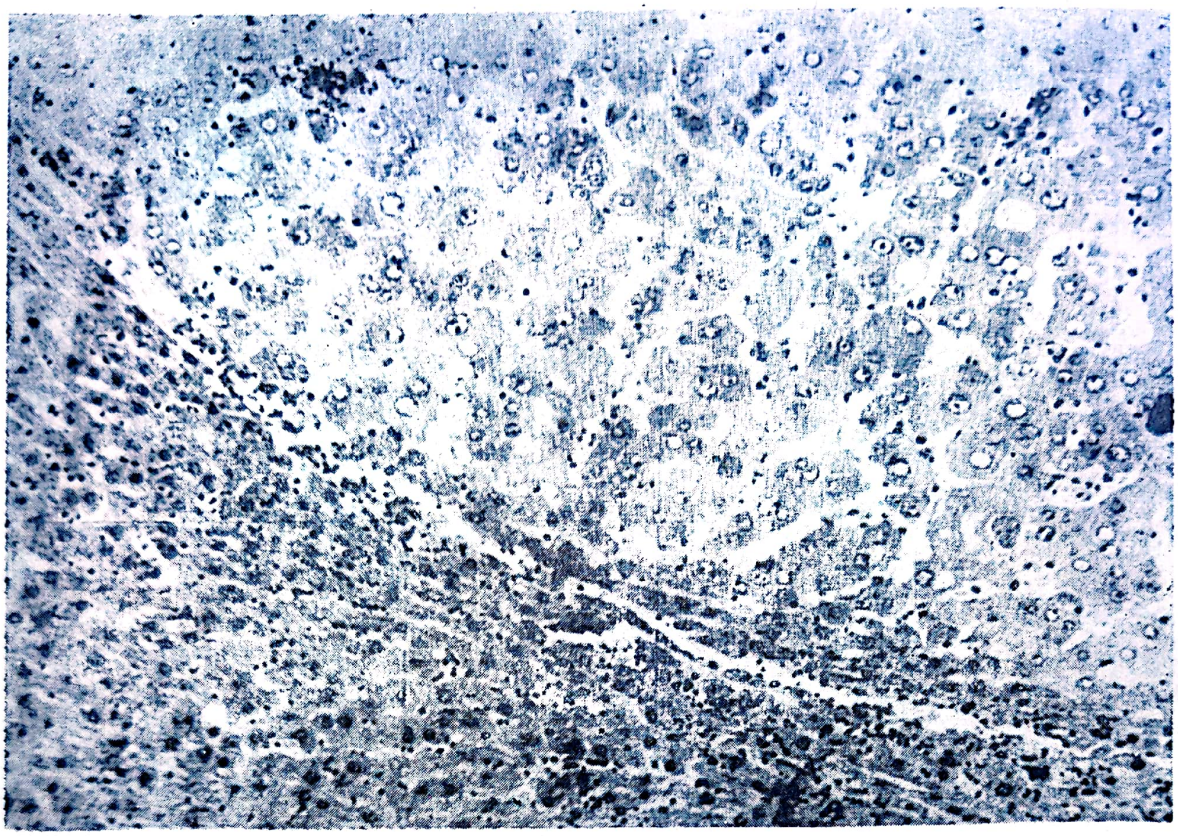


Fig. 66. — Zonă de frontieră a unui adenom hepatic produs prin dietilnitrosamină și țesutul hepatic vecin (col. HE ; × 100).

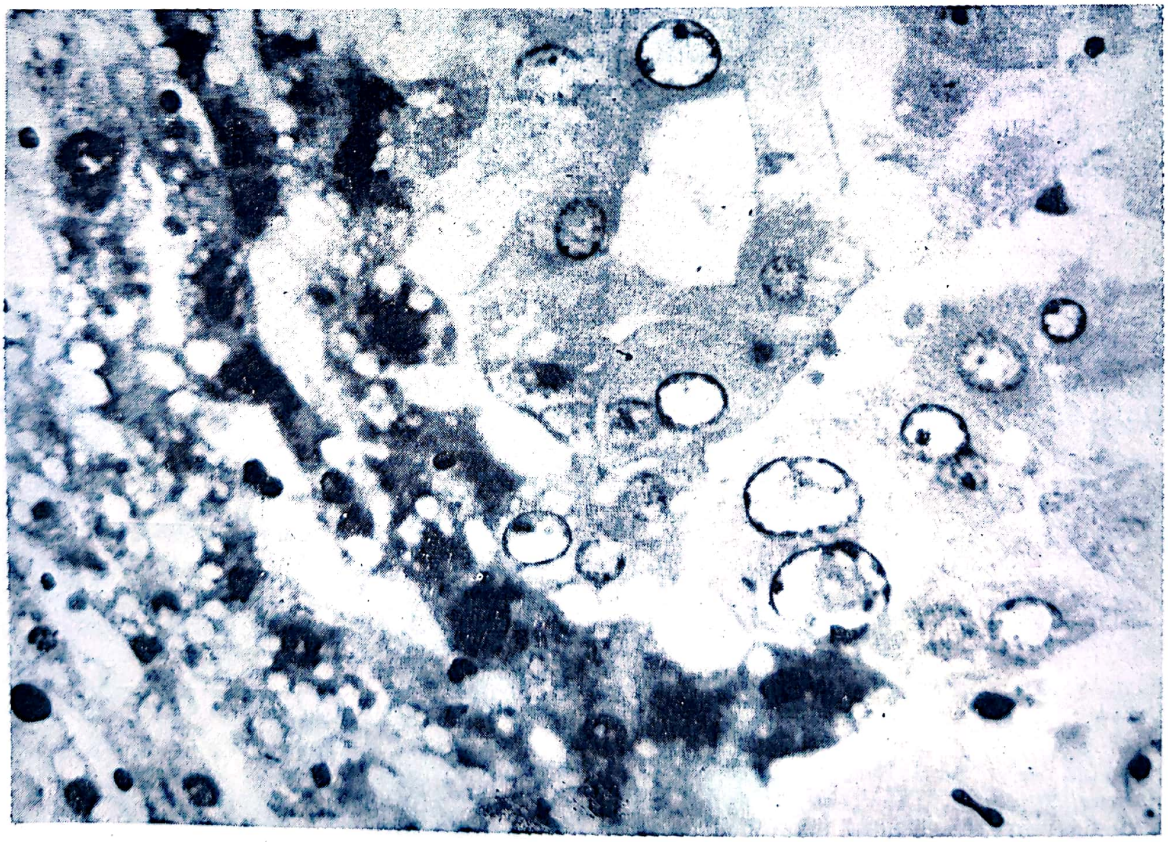


Fig. 67. — Adenom hepatic produs prin dietilnitrosamină. Nucleii hepatomului apar măriți ca volum însă palizi, cu cromatina în cantitate redusă (col. HE ; × 200).

Scanned with OKEN Scanner

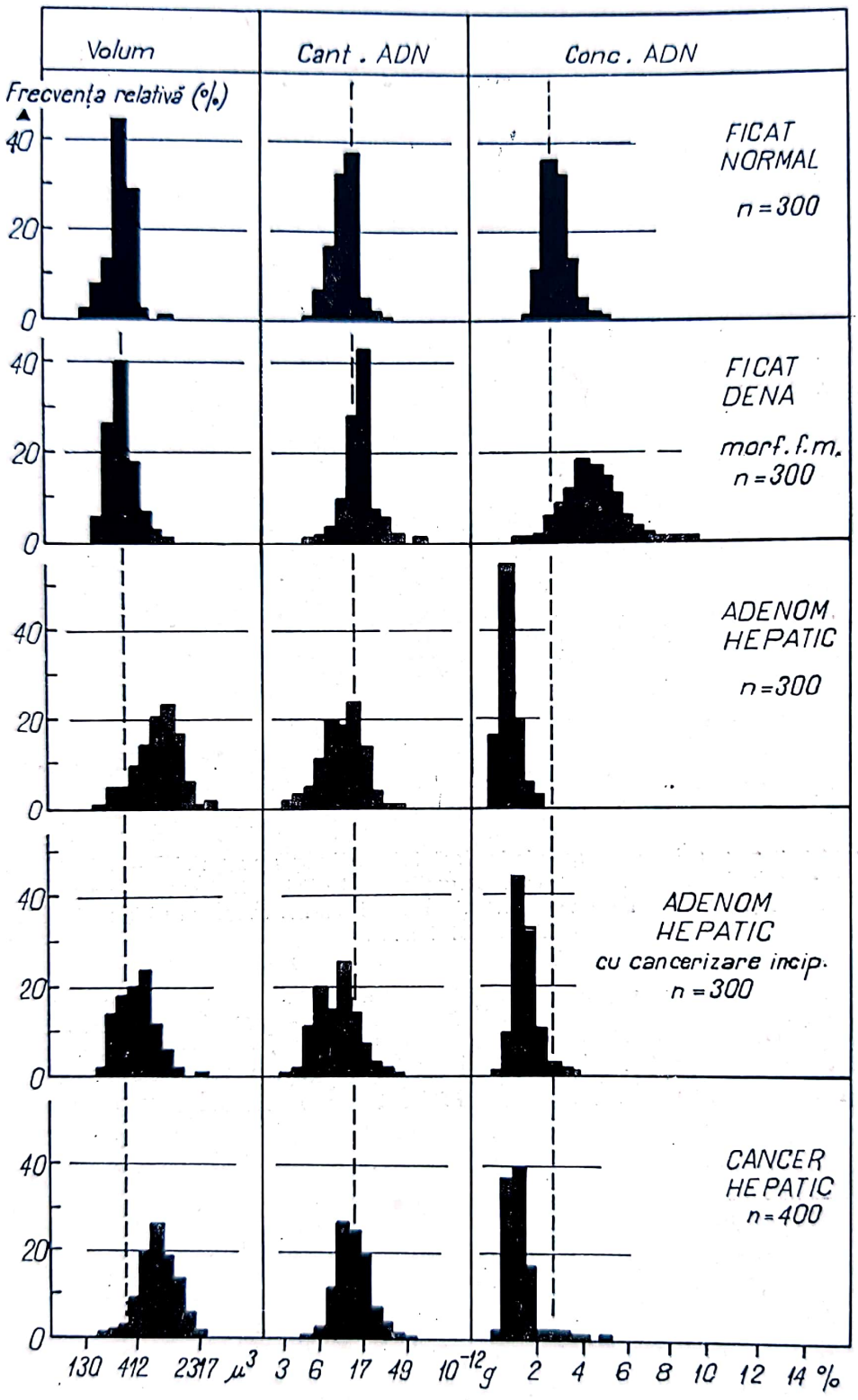



Fig. 68. — Histograma treptelor de dezvoltare în cancerogeneza hepatică. Se constată creșterea volumelor nucleare paralel cu etapa de malignizare. Cantitatea de ADN rămîne constantă dar concentrația de ADN scade.

Scanned with OKEN Scanner

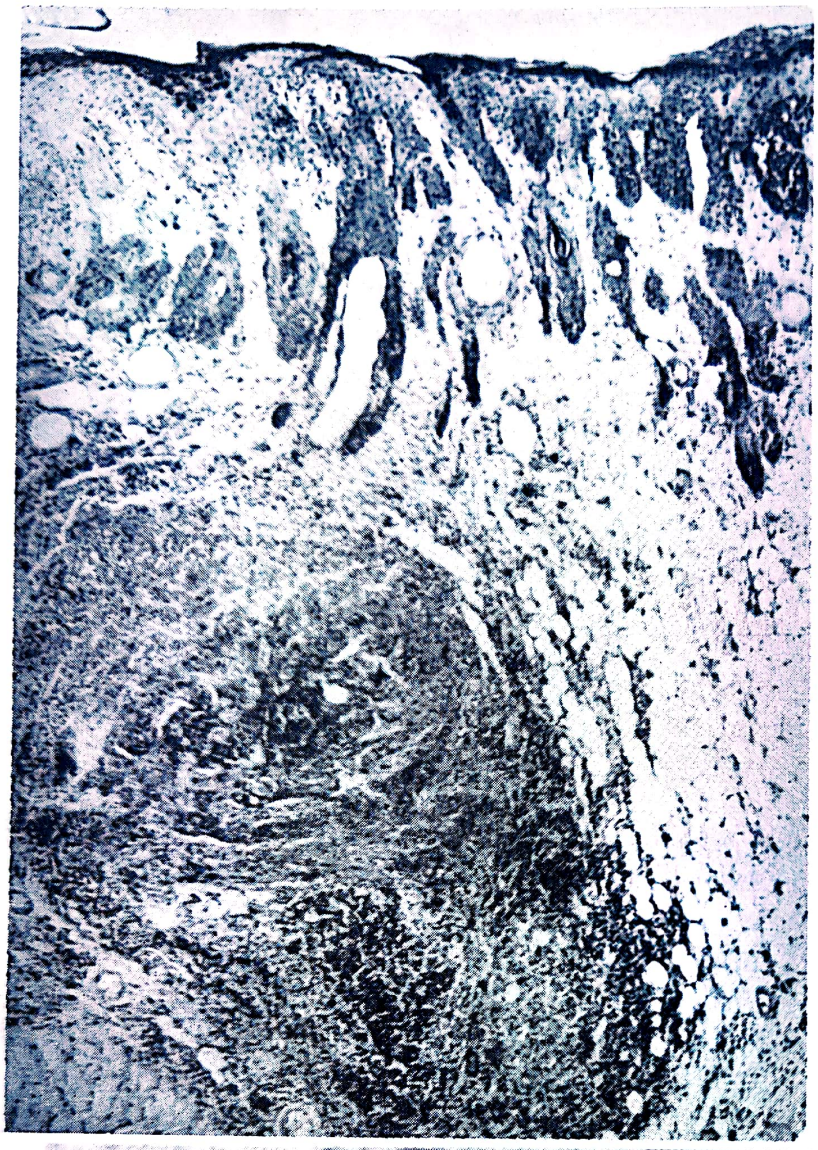


Fig. 69. — Vedere de ansamblu a unei papilomatoze cutanate prin benzpiren în epiderma de șoarece. În profunzime nuclei mari, tahicromatici (col. HE ; × 50).

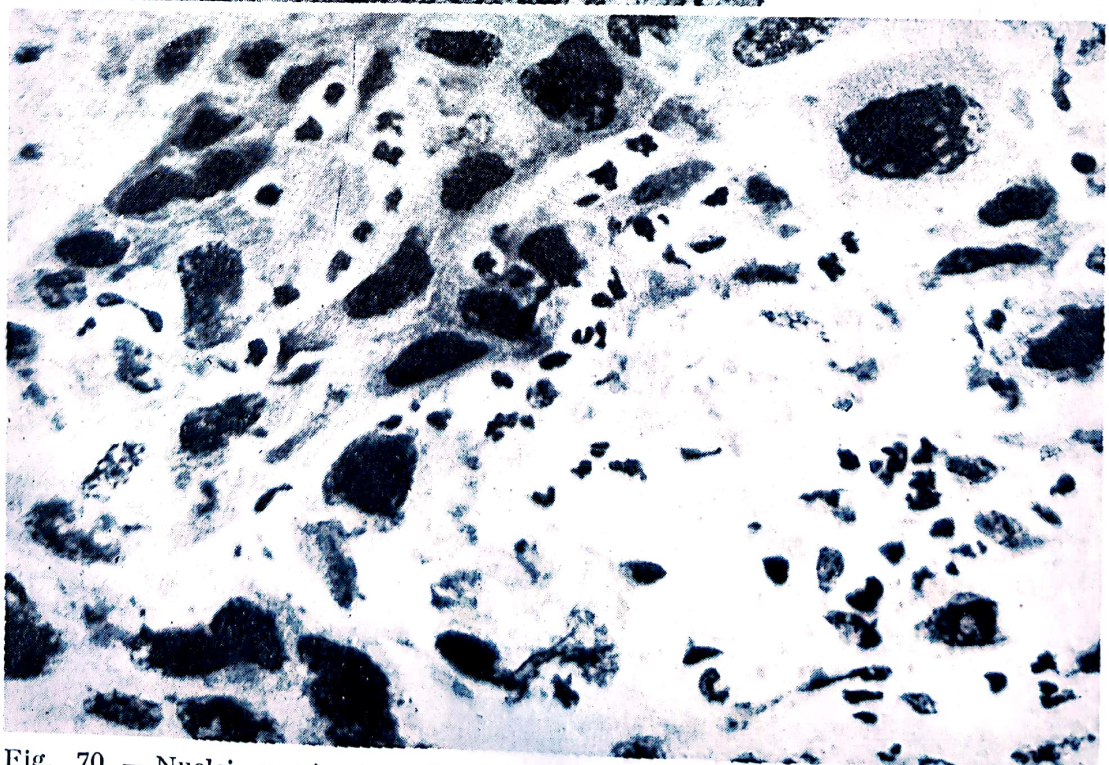


Fig. 70. — Nuclei mari, inegali, tahicromatici în zona neoplazică a unei proliferări cutanate induse prin benzpiren (col. galocianin-cromalaun ; × 100).

Scanned with OKEN Scanner

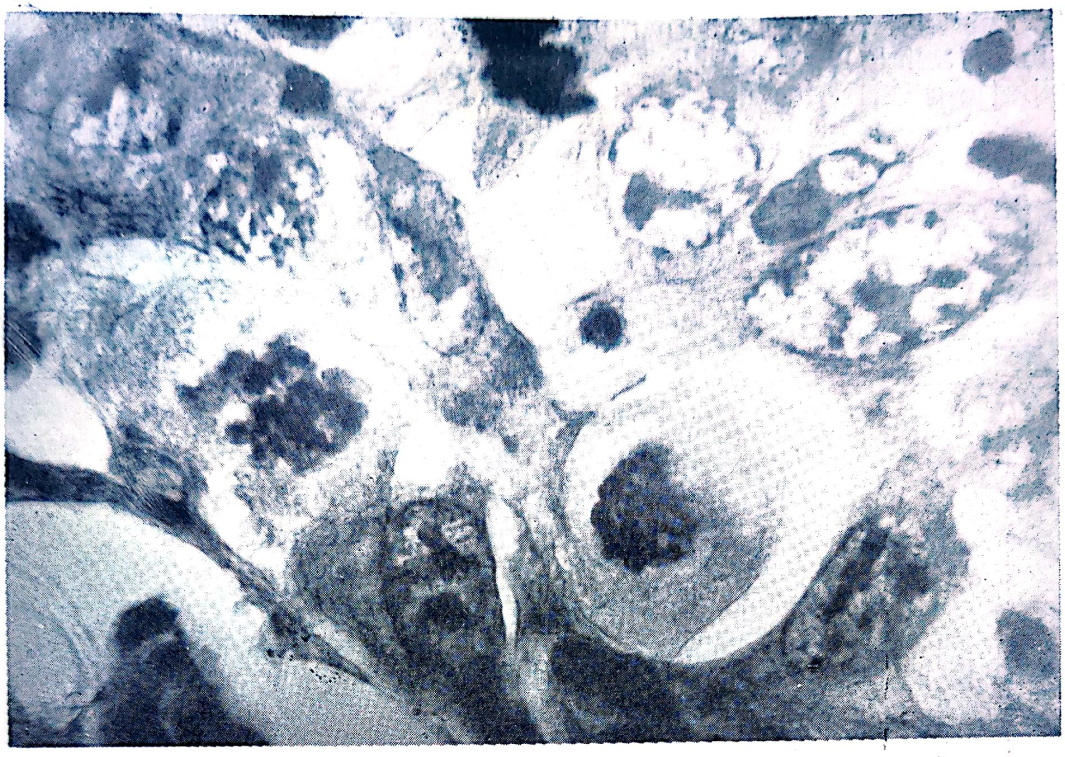


Fig. 71. — Fotografie în lumină ultravioletă a epidermei tratată cu benzpiren. Se observă cantități variabile de acizi nucleici, precum și o mitoză (× 1 180).

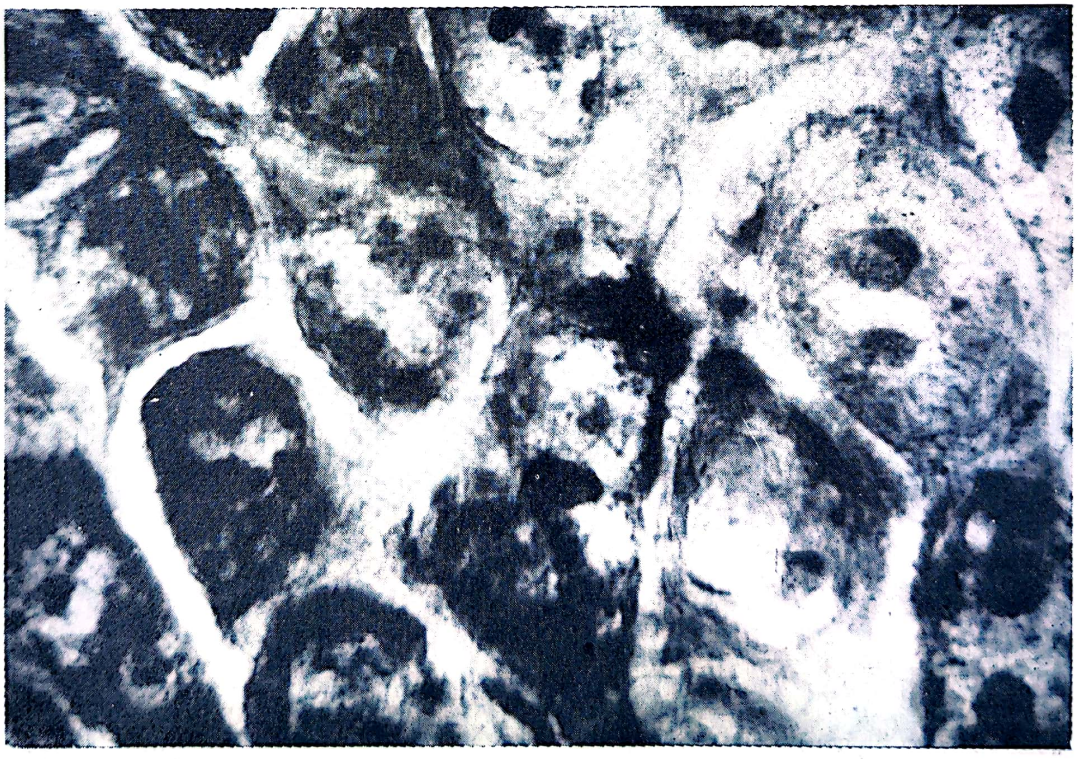


Fig. 72. — Nuclei neoplazici conținînd cantități abundente de acizi nucleici. Preparat necolorat prin pielea tratată cu benzpiren. Fotografie în ultraviolet (× 1 200).

Scanned with OKEN Scanner

nanţa nucleilor în faza S şi a nucleilor tetraploizi în stratul bazal. Hiperplaziile epiteliale şi papiloamele după DMBA şi ulei de croton arată aceeaşi distribuţie a ADN, ca şi după tratamentul cu metilcolantren.

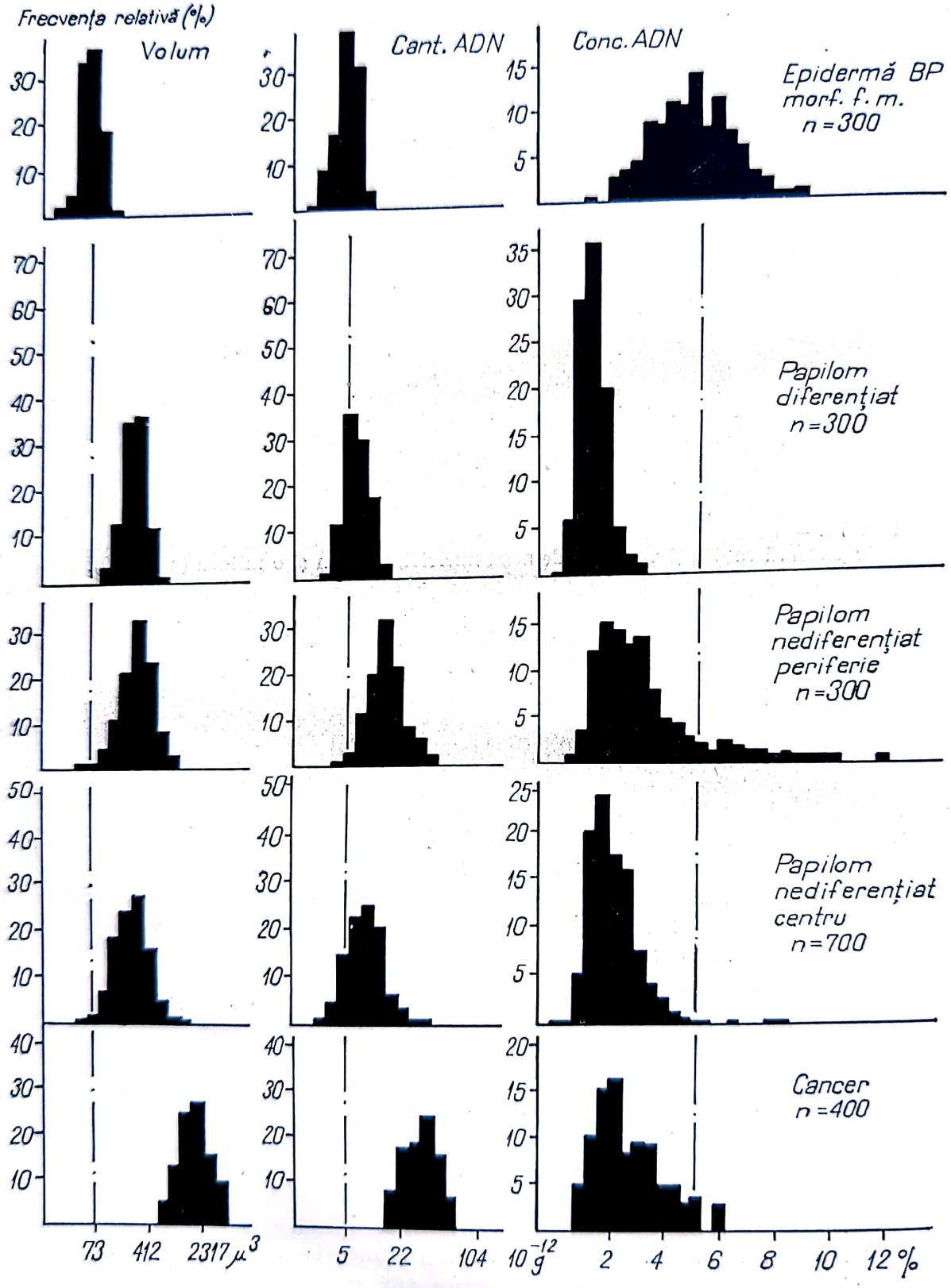



Fig. 73. — Histogramele etapelor cancerizării cutanate. Se remarcă creşterea volumelor nucleare şi a cantităţii de ADN paralel cu etapele malignizării.

Din observaţiile lui Rohrbach şi colab. (449) rezultă că hiperplaziile epiteliale produse prin agenţii menţionaţi se însoţesc de o scurtare a fazei $G_1$, în timp ce faza $G_2$ se alungeşte. Totodată apar în stratul bazal numeroase valori tetra- şi octoploide. În stratul spinos se observă în special după ulei de muştar şi metilcolantren nuclei în fazele S şi $G_2$.

Din această prezentare, considerăm că estimarea exclusiv a cantităţii de acizi nucleici nu este un criteriu suficient pentru aprecierea malignităţii şi a treptelor de dezvoltare neoplazică.

Problema distribuţiei anormale a valorilor ADN şi a aneuploidiei cromozomiale nu este nouă în oncologie. Distribuţia ADN în tumori poate fi comparată cu linia de bază cromozomială („stem-line"). Trebuie însă subliniat că o distribuţie regulată a ADN nu exclude o tumoare malignă (467), (469), (471). O creştere a volumului nuclear, considerată de Benninghoff (39) ca mărime funcţională, poate apărea prin poliploidie, aneuploidie, politenie, creşterea sintezei proteice sau a sintezei ADN, încorporarea de apă şi metaboliţi (438), dar nu implică nici un element de evaluare asupra gradului de diferenţiere a unui grup de celule.

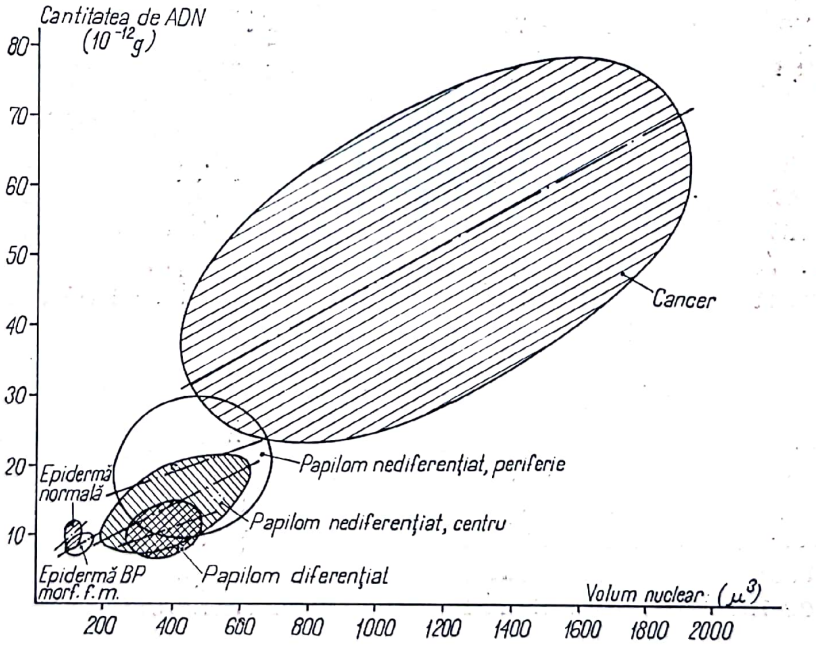



Fig. 74. — Reprezentarea conţinutului de ADN ca funcţie a volumului nuclear. Sporirea volumului nuclear este asociată cu o creştere a ADN. Diminuarea corelaţiei volum nuclear—ADN în epiteliul normal şi în toate etapele malignizării.

Diminuarea corelaţiilor volum nuclear — cantitate de ADN apare evidentă în cursul etapelor carcinogenezei cutanate (fig. 74) şi hepatice (fig. 75). Comparînd valorile nucleilor din pielea normală de şoarece cu

datele măsurătorilor efectuate pe nucleii indemni din pielea tratată cu benzpiren, dar situaţi la distanţă de zonele tumorale, rezultă că volumele nucleare şi cantităţile de ADN sînt foarte apropiate. Cu toate acestea,

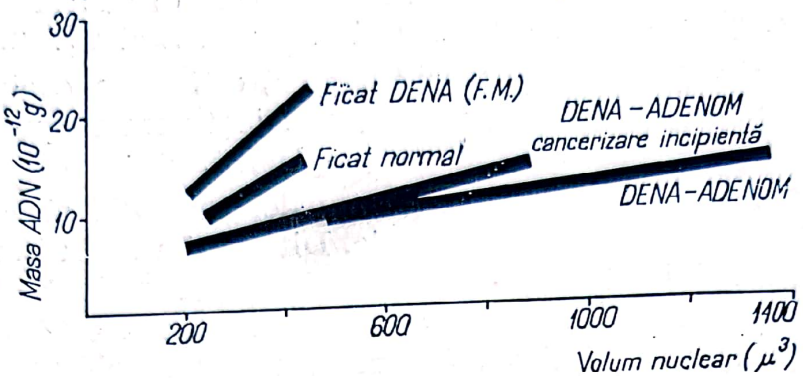



Fig. 75. — Corelaţia dintre volumul nuclear şi cantitatea de ADN în cursul malignizării hepatice prin dietilnitrosamină. Se remarcă scăderea corelaţei în adenom şi cancerizarea incipientă. Nucleii din jurul zonelor de adenom au o corelaţie mai bună probabil datorită faptului că, din cauza regenerării, mai multe celule sînt în faza S.

corelaţia volum nuclear — masă ADN prezintă în cazul pielii tratate cu 3,4-benzpiren o pantă mai redusă a dreptei de regresiune. Această pierdere a corelaţiei, redată prin diminuarea pantei dreptelor de regresiune, apare în toate etapele de transformare tumorală, traducînd mai bine, după părerea noastră, esenţa transformării neoplazice. Un argument important în susţinerea acestei ipoteze ni se par rezultatele histofotometrice obţinute după aplicarea pe pielea şoarecilor a unei soluţii de 0,02 μM de forbol-ester A 1. Această substanţă determină o hiperplazie cutanată reversibilă. Măsurătorile histofometrice efectuate de noi în momentul hiperplaziei maxime, adică între 16 şi 36 de ore de la momentul aplicării, se situează pe o linie de regresiune paralelă cu dreapta de regresiune a tegumentelor normale. Dimpotrivă, în pielea tratată cu 3,4-benzpiren, însă fără nici un fel de modificare nucleocitoplasmatică vizibilă în colorаţiile uzuale sau în lumină ultravioletă (fig. 76 şi 77), corelaţia ADN — volum este diminuată şi se exprimă prin scăderea pantei acestei drepte (fig. 78). Scăderea corelaţiei volum nuclear — ADN ar putea deci să reprezinte o etapă foarte precoce în cursul transformării neoplazice, cînd alte metode morfologice nu pot încă surprinde începutul transformării maligne.

## Morfologia cantitativă a tumorilor umane

Examinarea cariometrică a unui număr de aproximativ 20 000 de nuclei tumorali din diferite neoplazii, cu punct de plecare variat, ne-a permis următoarele concluzii :

Valorile cariogramei tumorale sînt de regulă simţitor mai mari şi mai variate comparativ cu ţesuturile normale de origine. Variaţii apreciabile se pot întîlni şi în diverse regiuni ale aceleiaşi tumori, în special în

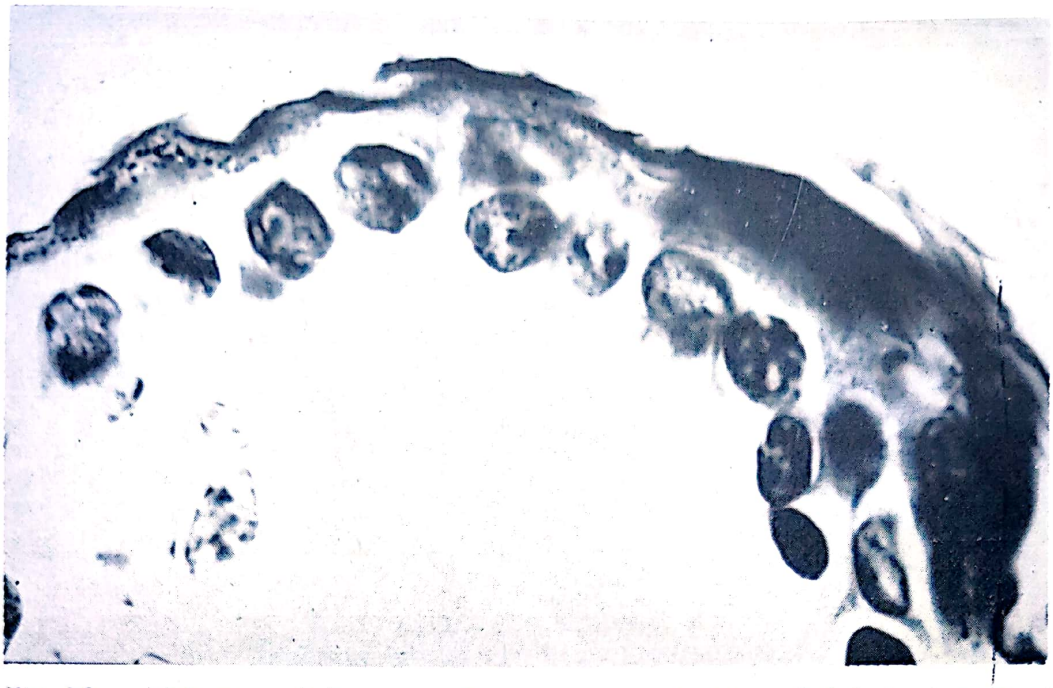


Fig. 76. — Piele normală de șoarece. Preparat necolorat, fotografiat în lumină ultravioletă. Se observă distribuția normală a acizilor nucleici (× 1 000).

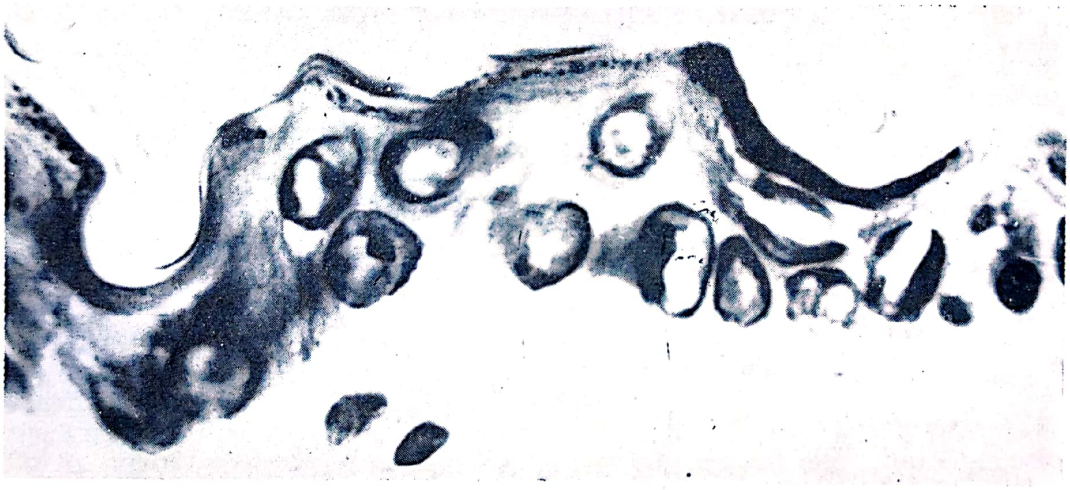


Fig. 77. — Piele de șoarece recoltată la distanță de zona pe care s-a aplicat 3,4-benzpiren. Preparat necolorat, fotografiat în lumină ultravioletă. Distribuție aparent normală a acizilor nucleici (× 1 000).

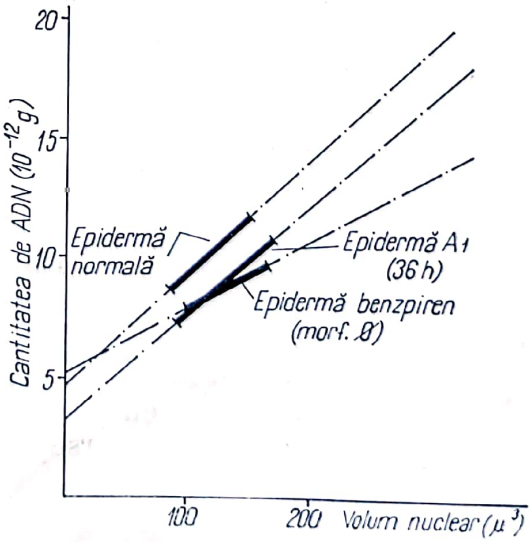



Fig. 78. — Scăderea corelației volum—ADN în tegumentul expus la benzpiren, dar fără modificări morfologice, în comparație cu pielea normală și cu cea expusă la cocarcinogenul $A_1$.

cancerele cu polimorfie extremă. Rezultă o anizocarie marcantă cu dispersie în exces a valorilor, traseul avînd o bază mult mai largă decît cel al țesutului matcă.

În fenomenul de anizocarie, o tendință caracteristică este predominanța macronucleilor, ajungînd în sarcomul polimorf (101), (103), (106) pînă la 3 500 $\mu^3$ (fig. 79 și 80). Se poate deci vorbi de o dextrodeviere netă a traseului tumoral. Trebuie însă subliniat că nici intensificarea anizocariei, nici a macrocariei nu aparțin exclusiv bolii canceroase. Observații comparative în ciroza hepatică (104) și hepatita epidemică (525) arată că nucleii hepatocitelor în cursul acestor afecțiuni pot ajunge la dimensiuni superioare celor din cariograma neoplaziilor hepatice. Se verifică încă o dată principiul că nu există leziuni canceroase strict specifice și că pentru diagnosticul diferențial esențială rămîne coroborarea dintre funcțional și morfologic.

Distribuția mărimilor nucleare se face uneori cu totul inegal pentru cancere, în sensul că dispersia valorilor nu urmează un anume proces morfogenetic. Fapt este că se găsesc pe traseul cariometric nuclei cu dimensiuni variabile, alternînd neregulat, dar nu la întîmplare. Reprezentarea grafică sub formă de traseu neîntrerupt pune în valoare o particularitate a cariogramei tumorale, și anume discontinuitatea valorilor. Aceasta se observă mai ales în cazurile cu dispersie marcantă a valorilor, de exemplu în sarcoame, așa că se întîlnesc lacune, adică lipsesc nuclei tumorali cu valori între unele mărimi. Se poate vorbi deci de un *hiatus nuclear canceros*, în legătură și cu aneuploidia din tumori.

Gruparea diverselor mărimi nucleare este cu totul alta în țesuturile neoplazice. În țesutul conjunctiv normal, cei mai mulți nuclei (circa 70%) au aproximativ același diametru, caracteristic pentru o anume etapă a ciclului fiziologic. Grafic, valoarea dominantă se prezintă ca un singur masiv înalt (103). Dimpotrivă, în țesuturile neoplazice, nu numai că se găsesc și alte valori nucleare mai mari sau mai mici decît volumul nucleilor normali, dar gruparea acestor valori se face cu totul diferit față de normal. În loc de traseul în unghi ascuțit, graficele arată o linie frîntă, un fel de platou accidentat, neregulat, plurimaximal. În evoluția celulei canceroase, începînd cu individualizarea unei noi celule și terminînd cu distrugerea ei, apar o serie de modificări. Una dintre acestea este și gruparea plurimaximală a mărimilor nucleare. Numărul crescut al maximelor pe grafice traduce încercări de noi adaptări morfofuncționale la nivelul nucleului și celulei în condițiile bolii canceroase. Poate rezulta un grad înalt de uniformizare, ca în cazul limfosarcomului (fig. 81), tumorii Grawitz etc., sau un grad minim de uniformizare, ca în retotel-sarcom (fig. 82 și 83), sarcom polimorf, glioblastom multiform etc. Cu aceste caratere s-ar putea vorbi de un sindrom *morfopatologic nuclear* în boala canceroasă. Trebuie însă insistat asupra faptului că nici macrocaria, nici vreun alt element al sindromului morfopatologic nuclear nu constituie un semn patognomonic de cancer — luat izolat — și nici de intensitatea malignizării. În contextul anatomoclinic, sindromul morfopatologic nuclear se poate compara însă de la o tumoare la alta, de la o localizare la alta, de la tumoare primară la metastaze, cu sau fără terapie etc.

Scanned with OKEN Scanner

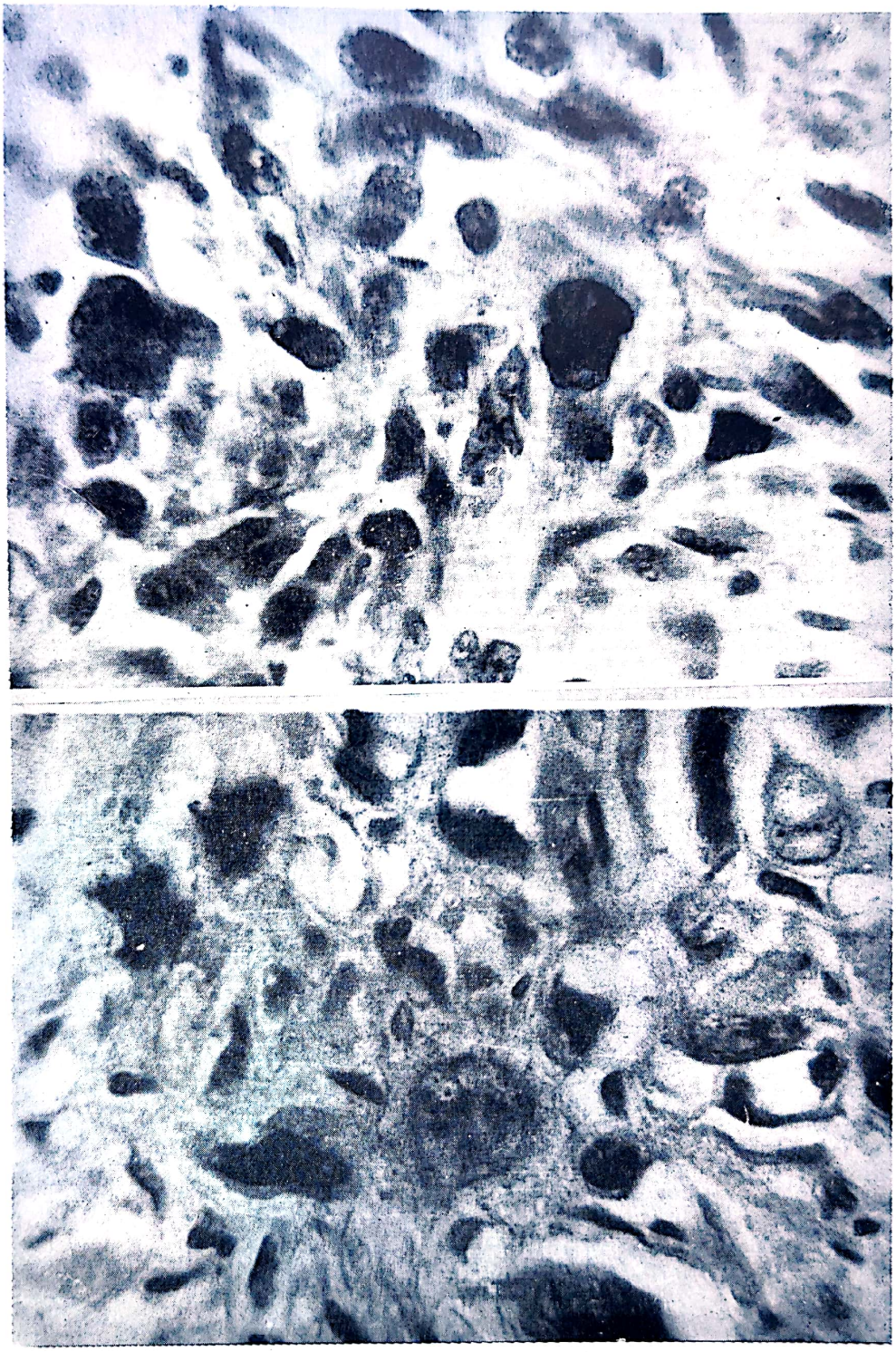


Fig. 79. Sarcom polimorf: anizocarie foarte marcantă cu predominanța nucleilor mari, cu atipii și monstruozități (× 1 000).

Scanned with OKEN Scanner

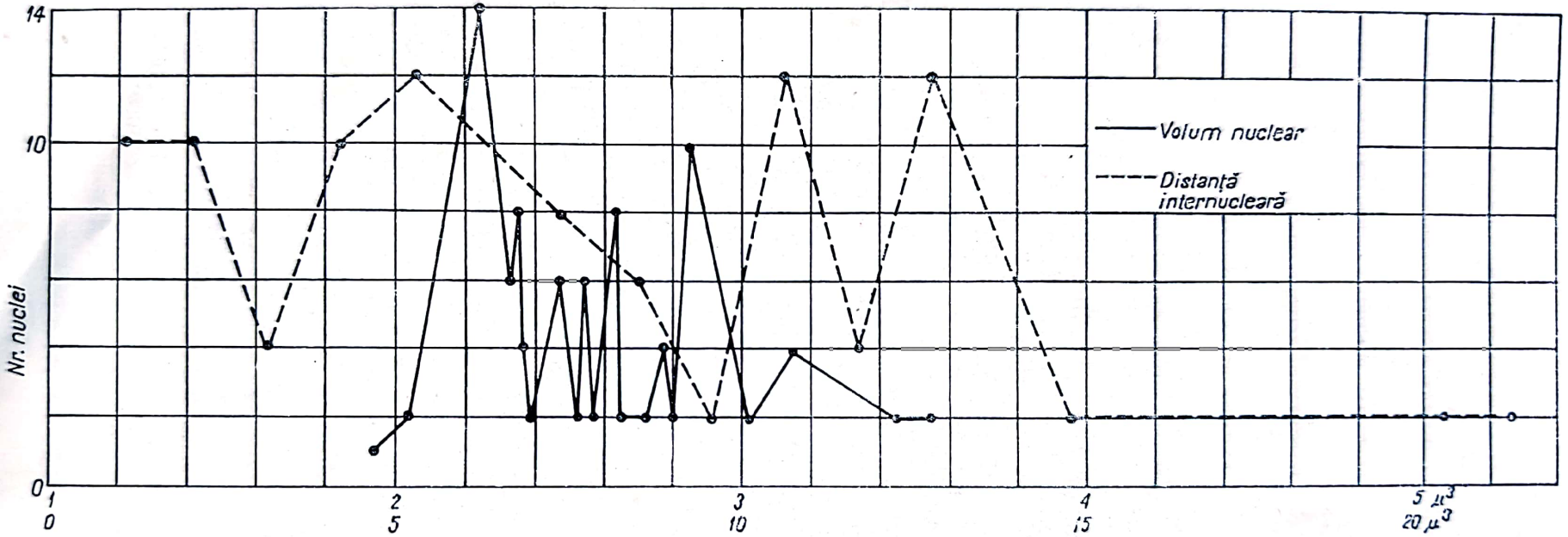



Fig. 80. — Cario-intercariograma sarcomului polimorf. Peste 80% din nuclei au volume mai mari ca 200 $\mu^3$.

Fig.81. — Cario-intercariograma limfosarcomului limfocitar.

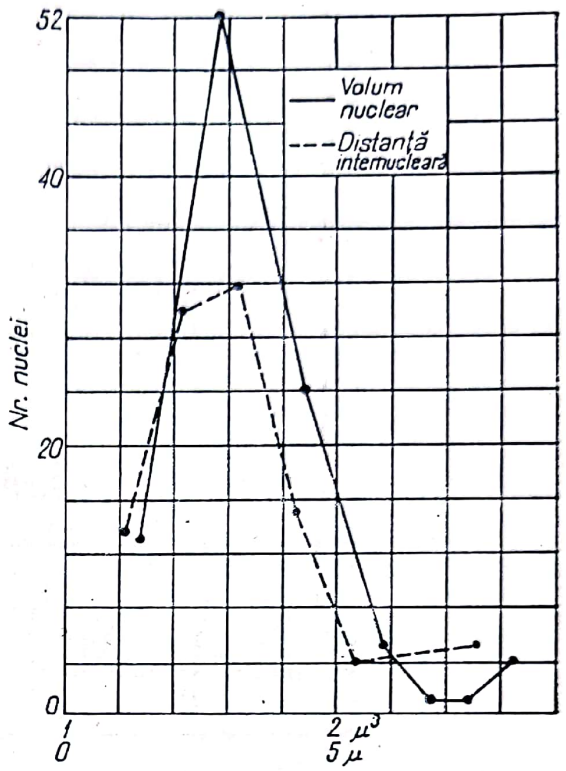
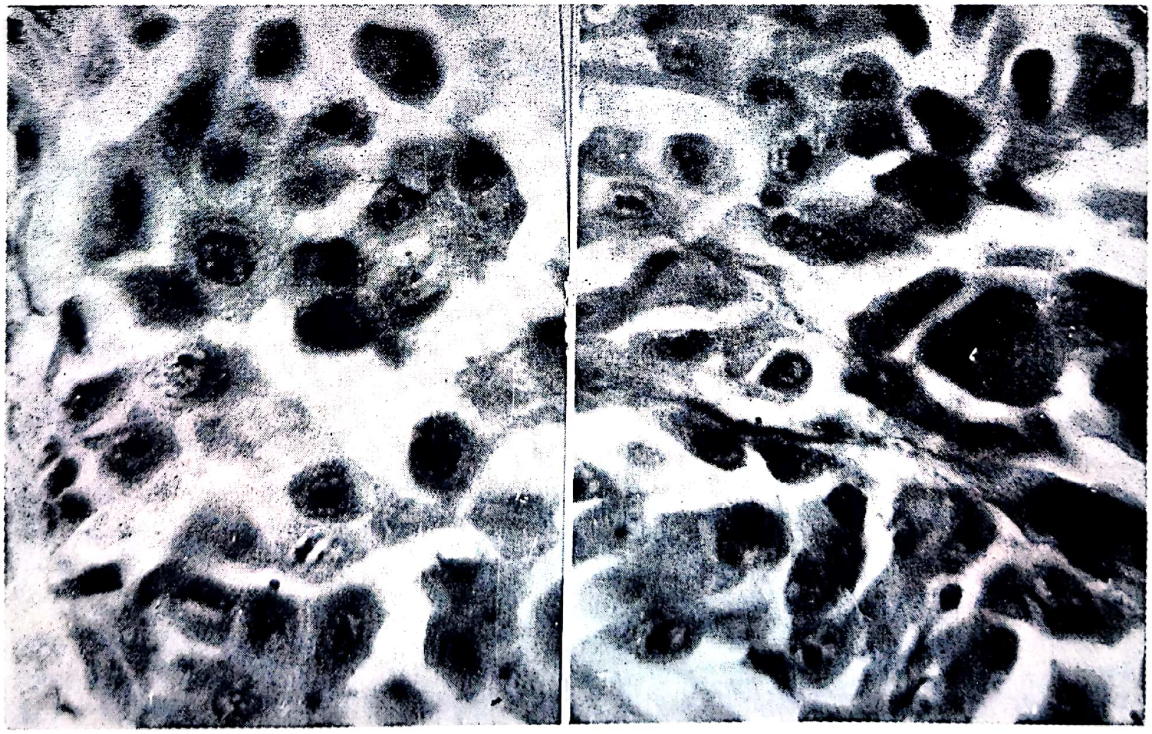



Fig. 82. — Retotel-sarcom cu inegalități nucleare marcante.



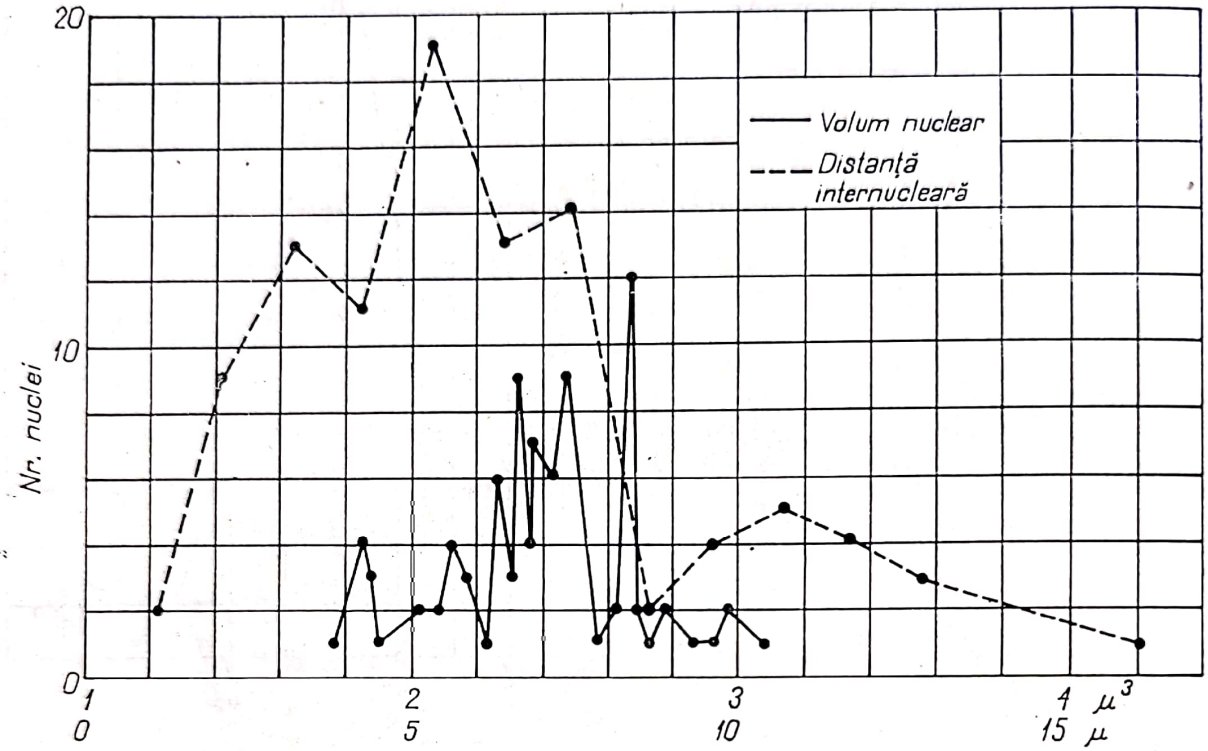



Fig. 83. — Cario-intercariograma retotel-sarcomului.

Scanned with OKEN Scanner

# An Introduction to a Quantitative Cyto-histological Morphology

(Summary)


Qantitative morphology gradually developed as an indispensable branch of modern research in medicine and biology. New data accumulate about karyometry, cytophotometry, interference microscopy, cytophluorometry, X-ray, microscopy, stereology, autohistoradiography.

Karyo- and interkaryometry as applied to normal and pathological conditions suggested the following conclusions: the nuclear dynamics parallels the anatomo-clinical picture. This synergism appears in most of the pathological conditions we studied, such as diseases of the liver, reticulo-endothelial system, endocrine glands, nervous system and neoplastic diseases. The histograms of neoplastic nuclei are quite irregular, dextrodeviated, with a "feverish" or "saw teeth" appearance. The lack of intermediary nuclear classes, as seen in neoplastic karyograms led to the concept of neoplastic nuclear hyatus, quite similar to leukemic hyatus. Quantitative variations of nuclear volumes could be expressed as a morphopathologic nuclear syndrome, corresponding to a quantitative nuclear formula, typical either of a group of diseases, evolutive steps or experiment stages. From this point of view one could speak of a quantitative cytoprognose.

Our cytophotometric studies about nucleic acids quantification were based upon the Feulgen and gallocyanin-chromalaun staining methods combined with the absorption in the ultra-violet light. Histones were visualized by means of the fast-green technique.

Some additional applications of cytophotometry are further discussed. Variations of nuclear volumes, nucleic acids quantities and concentrations in human epidermis in different groups of ages were followed up. The nuclear volumes of the basal cells are twofold larger as compared to those of prickle cells.

Correlated with age, after 60 years a 40% decrease of nuclear volumes and nucleic acids content in all nuclei of investigated epidermis layers was observed. On the contrary, it was striking to remark the constant nucleic acids concentration, 7%, in all subjects regardless of age. In so far, the concentration of nucleic acids could be considered as a biological constant.

Human and experimental cancerogenesis is a field of researches where karyo-cytophotometry can bring most valuable results. Aiming to find out quantitative parameters of cancerogenesis, we used the correlation between nuclear volume and DNA content. The most probable dependence of DNA content (M) on nuclear volume (V) is expressed as:

$$M = cV + \text{constant}$$


Scanned with OKEN Scanner

In this equation (c) is the concentration ($gcm^{-3}$) and represents the direct measurement of correlation.

Divergence of regression lines indicates a lower cell "coordination" thus corresponding to a loss of cell differentiation, without modification of DNA content. The diminution of the slope of the regression line could therefore be considered as indicating a loss of differentiation, i.e. the beginning of malignancy. To verify this hypothesis we investigated the correlation between nuclear volumes and DNA content in various hypochromatic and hyperchromatic neoplasia namely, with large or small content of nucleic acids. In all cancerogenetic stages of both neoplastic types, the regression lines have a diminished slope as compared with the normal surrouding tissue. A diminished value of nuclear volume-DNA correlation was thus observed. By the same method, we compared the cutaneous effect of the co-carcinogenic agent phorbol-esther A1 with that of the carcinogen 3,4-benz-pyrene.

It resulted that the maximal hyperplasia produced by the cocarcinogen A1 is followed by a reversible hyperplasia. The regression straight line accordingly has a parallel course with the straight line of the normal skin whereas benz-pyrene treated skin free of histological changes shows a diminution of correlation between nuclear volume and DNA content. This result seems the more important because neither histogram nor histology far from neoplastic zones showed no pathological changes. The diminished correlation between nuclear volume and DNA content could be therefore be taken as the first morphologic objective phenomenon due to a carcinogenic action.

Interference microscopy permitted important contributions describing significant increase of dry mass in neoplastic cells, control of dry mass due to hormones, nucleo-cytoplasmic alterations in leukemia.

Stereological methods brought valuable data concerning the volumetric analysis, measurement of nuclear area, estimation of area-volume ratio, measurement of thickness in histological objects and counting of subcellular particles.

By means of optical and electrono-optical autohistoradiography were studied : the site of DNA synthesis, the building up of RNA, the role of Golgi complex in protein concentration, the hormones localization. We observed by studying the $^{3}H$-thymidine uptake in cultivated pinealocytes that thyroxine stimulated DNA synthesis, whereas cortisole, testosterone and stilboestrol diminished the number of labelled nuclei.

From our own observations as well as from literature data it results that quantitative morphology, as an interdisciplinary modern branch of medicine, is a subtle indicator of celullar and nuclear metabolism not yet detectable with routine histological procedures. Moreover its applications in the near future as an investigation tool could deeply change our present views on diagnosis, therapy and prognosis.

Scanned with OKEN Scanner

# Bibliografie


1. Alfert M., Biol. Bull., 1952, **103**, 145.
2. Alfert M., Biol. Bull., 1955, **100**, 1.
3. Alfert M., Bern H. A., Proc. nat. Acad. Sci. Wash., 1951, **37**, 202.
4. Alfert M., Bern H. A., Kahn R. H., Acta anat., 1955, **23**, 185.
5. Alfert M., Geschwind I. I., Proc. nat. Acad. Sci., Wash., 1953, **39**, 991.
6. Alfert M., Swifft H., Exp. Cell Res., 1953, **5**, 455.
7. Allfrey V. G., Mirsky A. E., *The chemistry of cell nucleus*, în *Advances in enzymology*, sub red. E. F. Nord, Interscience, New York, 1955.
8. Althman F. P., Histochemie, 1969, **19**, 363.
9. Altmann H. W., Z. Krebsforsch., 1952, **58**, 632.
10. Ambrose E. J., citat de K. F. Ross, *General cytochemical methods*, sub. red. J. F. Danielli, Acad. Press, New York, 1959, **2**.
11. Ambrose A. M., Christensen H. E., Rather L. J., J. amer. Pharm. Ass., 1953, **42**, 364.
12. Anderson W. A., J. Ultrastruct. Res., 1969, **26**, 95.
13. Antonioli J. A., Biol. lat., 1959, **12**, 369.
14. Arndt G., Z. Krebsforsch., 1935, **41**, 393.
15. Arnold A., Acta anat. 1951, **12**, 396.
16. Arnold R., Sandritter W., Histochemie, 1967, **10**, 88.
17. Arranz S. B., Arch. Neurobiol. 1957, **20**, 156.
18. Ashley C. A., Peters T., J. Cell Biol., 1969, **43**, 237.
19. Ashworth C. T., Reid H. C., Amer. J. Path., 1947, **23**, 269.
20. Atkin N. B., în *Introduction to quantitative cytochemistry*, sub red. G. L. Wied, G. F. Bahr, Acad. Press, New York, Londra, 1970.
21. Atkin N. B., Richards B. M., Brit. J. Cancer, 1956, **10**, 769.
22. Atkin N. B., Richards B. M., Ross A. J., Brit. J. Cancer, 1959, **13**, 773.
23. Bachmann K., Ärtzl. Forsch., 1950, **4**, 577.
24. Bachmann K., Cowden R. R., Chromosoma, Berl., 1965, **17**, 22.
25. Bachmann L., Salpeter M. M., în *Quantitative electron microscopy*, sub. red. G. F. Bahr, E. H. Zeitler, Williams a. Wilkins, Maryland, 1965.
26. Bahr F. G., Wied L. G., Acta cytol., 1966, **10**, 393.
27. Balan M., Arateı H., Morf. norm. pat., 1968, **13**, 417.
28. Band R. N., Machemer C., Exp. Cell Res., 1963, **31**, 31.
29. Barer R., Nature, Lond., 1952, **169**, 366.
30. Barer R., Nature., Lond., 1953, **172**, 1097.
31. Barer R., Nature, Lond., 1954, **174**, 1027.
32. Barka T., Ornstein L., J. Histochem. Cytochem., 1960, **8**, 208.
33. Barnard E. A., Int. Rev. Cytol., 1970, **29**, 213.
34. Beams H. W., King R. L., Anat. Rec., 1942, **83**, 281.
35. Becher S., *Untersuchungen über die Echtfärbung der Zellkerne mit künstilichen Beizenfanbstoffen*, Borntraeger, Berlin, 1921.
36. Beck L. V., Fedynsky N., Endocrinology, 1967, **81**, 475.
37. Bellairs R., J. Embryol. exp. Morph., 1955, **3**, 242.
38. Benninghoff A., Anat. Nachr., 1949, **1**, 50.
39. Benninghoff A., Mon. Zool. Ital., 1953, **61**, 84.
40. Bern H. A., Alfert M., Rev. brasil. Biol., 1954, **14**, 25.
41. Beswich T., J. Path. Bact., 1958, **76**, 598.
42. Bibbiani G., Tongiani R., Histochemie, 1973, **35**, 180.
43. Bielanska I., Osuchowska Z., Folia histochem. cytochem., 1972, **10**, 19.
44. Biereigel R. O., Z. Zellforsch., 1938, **28**, 341.
45. Biesele J. J., Cancer Res., 1944, **4**, 529.


Scanned with OKEN Scanner

Redactor: RODICA GHENGHEA
Tehnoredactor: SONIA BÂRZEANU

*Bun de tipar 25.05. 1976. Tiraj 2050. Hîrtie cretată 70 × 100 de 100/gm². Format 16/70 × 100. Coli de tipar 10,75. C.Z. pentru biblioteci mari și C.Z. pentru biblioteci mici: 576.31.*

c. 401 I. P. INFORMAȚIA
str. Brezoianu nr. 23–25, București
REPUBLICA SOCIALISTĂ ROMÂNIA

Scanned with OKEN Scanner

20

Lucrarea abordează o problemă extrem de modernă în morfologie. Tendința de a reda cifric relații nucleo-citoplasmice, particule subcelulare, activități cito-enzimatice a devenit o necesitate în cercetarea științifică modernă. Exprimarea cifrică permite o apreciere mai exactă a fenomenelor morfologice, înlesnind interpretări dinamice ale fiziologiei și fiziopatologiei celulare și subcelulare.

Bazat pe material personal și pe date din literatură, autorul face o trecere în revistă a principalelor ramuri ale morfologiei cantitative moderne: cario-citometrie, cito-fotometrie, microscopie de interferență, microscopie cu raze X, cito-fluorimetrie, stereologie, autohistoradiografie. În realitate, fiecare dintre acestea reprezintă un domeniu amplu, atestînd caracterul multi- și interdisciplinar al morfologiei cantitative.

Un capitol larg dezvoltat este dedicat aplicațiilor morfologiei cantitative în diferite condiții nosogenice, ca afecțiuni ale ficatului, sistemului reticulo-endotelial, endocrinopatii, boli neurologice, boala canceroasă.

Bogat ilustrată prin fotografii și grafice, în majoritate originale, cu o bibliografie amplă, lucrarea se adresează nu numai morfologilor și anatomopatologilor, ci și medicilor și biologilor dornici să-și întregească cunoștințele într-un domeniu de stringentă actualitate.

EDITURA
ACADEMIEI
REPUBLICII
SOCIALISTE
ROMÂNIA

Lei 13,50

Scanned with OKEN Scanner